

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE FILMES FINOS
DE VIDRO NIOBO-FOSFATO POR
DEPOSIÇÃO A LASER PULSADO

Carolina Kaminski Sanz



PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE FILMES FINOS DE VIDRO NIOBO-FOSFATO POR DEPOSIÇÃO A LASER PULSADO

Carolina Kaminski Sanz

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Metalúrgica e de Materiais, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Metalúrgica e de Materiais.

Orientadores: Sérgio Álvaro de Souza Camargo
Junior
Aline Raybolt dos Santos

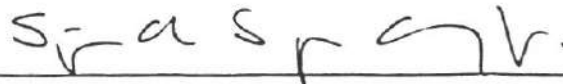
Rio de Janeiro
Abril de 2017

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE FILMES FINOS DE
VIDRO NIOBO-FOSFATO POR DEPOSIÇÃO A LASER PULSADO


Carolina Kaminski Sanz

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE)
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE MATERIAIS.

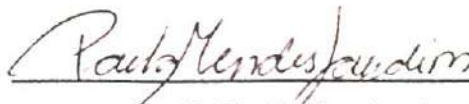
Examinada por:



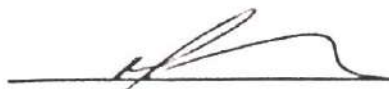
Prof. Sérgio Alvaro de Souza Camargo Junior, D.Sc.



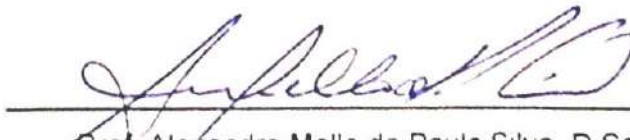
Prof.^a Aline Raybolt dos Santos, D.Sc.



Prof.^a Paula Mendes Jardim, D.Sc.



Prof. Marcelo Henrique Prado da Silva, D.Sc.



Prof. Alexandre Mello de Paula Silva, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

ABRIL DE 2017

Sanz, Carolina Kaminski

Produção, Caracterização e Avaliação in Vitro de Filmes Finos de Vidro Niobo-Fosfato por Deposição a Laser Pulsado/ Carolina Kaminski Sanz. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2017.

X, 69 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Sérgio Álvaro de Souza Camargo Junior

Aline Raybolt dos Santos

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2017.

Referências Bibliográficas: p. 62-69.

1. Vidros Bioativos. 2. Osteointegração. 3. PLD. I. Camargo Junior, Sérgio Álvaro de Souza *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. III. Título.

Dedicatória

Dedico este mestrado à minha mãe, Cristiane, pois todas as minhas conquistas foram por sua causa. Eu te amo!

Agradecimentos

Ao professor Sérgio Camargo pela orientação e troca de conhecimento. Agradeço a atenção, dedicação e os questionamentos que, ao longo do trabalho, me impulsionaram em busca das melhores respostas.

À professora Aline Raybolt, que me indicou e confiou em mim desde o princípio dessa nova etapa da minha vida. Obrigada pelo carinho, atenção, compreensão, apoio, enfim, obrigada por tudo.

Ao professor Marcelo Prado, membro atuante ao longo de todo o trabalho, pela ilustre orientação, conhecimento e tempo dedicado.

Ao professor Alexandre Mello e aos colegas do laboratório de superfícies do CBPF, em especial a Gabriela e Elvis, que me acolheram e colaboraram diretamente com a evolução do meu trabalho.

Aos professores do PEMM/UFRJ, por tornarem essa experiência única e cheia de novos conhecimentos e desafios.

Aos meus queridos colegas do Laboratório de Recobrimentos Protetores, Sandra, Tiago, Mauro, Rodriguinho, Bruno, Ricardos, Felipe, Willian, Lucas e Amal, pela ajuda e apoio nos momentos difíceis e risadas nos momentos divertidos. Minha querida Família Recobrimentos, obrigada por tudo.

Aos colegas do Laboratório de Cerâmicos do IME, em especial ao Rubens Marçal e Daniel Navarro, pelo acolhimento, ajuda e carinho dedicados a mim e ao meu trabalho.

À professora Elena Mavropoulos e aos colegas do laboratório de cultura celular do CBPF, em especial Marcelo Tanaka e Suzana, por colaborarem e acrescentarem sua ajuda e conhecimentos ao meu trabalho.

Ao meu querido amigo Felipe Alencastro, pois sem ele teria enlouquecido com toda a física e matemática das disciplinas e não chegaria aqui hoje. Obrigada por todos os dias!

À minha querida amiga Beatriz Canabarro pela amizade de todos os dias e pelos divertidos momentos na hora do almoço.

Aos meus amigos, que ao longo desses anos depositaram confiança em mim e tornaram tudo mais feliz, em especial Ana Carolina, Letícia, Ana Laura, Luciana, Maria Fernanda, Luíza, Julia, Larissa, Diana, Ana Luisa, Caio, Amanda, Maria Berry, Mariana, Flávia, Ramon, Anna Paula, Janini e Gabi.

Aos meus amigos do PEMM, Malí, Mariana, Samuel, Aline, Leandro e Zé. Obrigada por estarem presentes nessa fase tão importante.

À minha família, minha mãe, irmão Felipe, Antônio e aos meus avós, Didi e Celião, que ao longo dessa trajetória torceram por mim e me deram força para concluir esse trabalho. Amo cada um de vocês!

Ao meu pai, Celio Sanz... Eu te amo!

Ao Diego Rodrigues, pela paciência e carinho que não me faltaram em nenhum dia ao longo do mestrado.

Ao meu amado Tio Luciano, que sempre esteve na torcida e me apoiando em cada decisão.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento do meu trabalho e a realização desse sonho. Obrigada!

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO IN VITRO DE FILMES FINOS DE VIDRO NIOBO-FOSFATO POR DEPOSIÇÃO A LASER PULSADO

Carolina Kaminski Sanz

Abril/2017

Orientadores: Sérgio Álvaro de Souza Camargo Junior

Aline Raybolt dos Santos

Programa: Engenharia Metalúrgica e de Materiais

A osteointegração dos implantes está relacionada com a capacidade da superfície do implante realizar ligações químicas diretas e fortes com o tecido ósseo adjacente. Tratamentos de superfície dos implantes são alternativas para conferir essas propriedades superficiais, dentre os quais se destacam os recobrimentos com materiais bioativos. Nesse trabalho foram sintetizados filmes finos de biovidro fosfatado com nióbio ($\text{CaF}_2\text{-CaO-Nb}_2\text{O}_5\text{-P}_2\text{O}_5$) em substratos de titânio visando à indução de bioatividade e a melhora na sua osteointegração. Os filmes foram depositados por *pulsed laser deposition* (PLD) e analisados por MEV, EDS, XPS, DRX, FRX, AFM, perfilometria, *scratch test*, contato focal, proliferação e diferenciação celular. Nas análises por XPS foram encontradas estruturas de $\text{CaNb}_2(\text{P}_2\text{O}_6)$ e NbO_x . Não foram identificadas fases cristalinas nos filmes, por se tratar de um material com estrutura amorfa. Em conjunto, os resultados indicam que a síntese do material e a deposição são reprodutivas: foi possível depositar filmes finos de vidro bioativo em titânio por PLD, houve transferência estequiométrica do alvo para os filmes e, após a deposição, o material permaneceu com sua estrutura vítrea. Os ensaios *in vitro* não revelaram diferenças estatisticamente significantes entre os filmes e o controle, apesar dos filmes depositados com 50 mJ apresentarem um aumento na quantidade celular e os filmes de 100 mJ apresentarem melhor espalhamento celular.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* EVALUATION OF THIN
BIOACTIVE NIOBO-PHOSPHATE GLASS FILMS BY PULSED LASER DEPOSITION

Carolina Kaminski Sanz

April/2017

Advisors: Sérgio Álvaro de Souza Camargo Junior
Aline Raybolt dos Santos

Department: Metallurgical and Materials Engineering

Implant osseointegration is related to the implant surface's ability to create strong and direct chemical bonds with adjacent bone tissue. Surface treatments are a way to obtain these surface properties. Among the different treatments, bioactive materials coatings stand out. In this work, thin niobo-phosphate bioactive glass ($\text{CaF}_2\text{-CaO-Nb}_2\text{O}_5\text{-P}_2\text{O}_5$) films were deposited by *pulsed laser deposition* (PLD) on Ti substrates aiming to enhance its bioactivity and osseointegration. Samples were analyzed by SEM, EDS, XPS, XRD, XRF, AFM, profilometry, scratch test, focal contact and cell proliferation and differentiation. In XPS analysis, $\text{CaNb}_2(\text{P}_2\text{O}_6)$ and NbO_x structures were found. Crystalline phases were not identified on the films, since the glass has an amorphous structure. Together, these results suggest that both material synthesis and deposition are reproducible. It was possible to deposit thin bioactive glass films on titanium by PLD, there was stoichiometric transfer from the target to the films and, after the deposition, the material's glassy structure was maintained. In vitro tests did not reveal statistically significant differences between deposited films and the Ti control samples, even though samples deposited with 50 mJ showed an increase in cell quantity, and samples deposited with 100 mJ presented better cell spreading.

Sumário

1.	Introdução	1
2.	Objetivos	3
3.	Revisão bibliográfica	4
3.1.	Tecido ósseo	4
3.2.	Biomateriais	7
3.3.	Vidros bioativos	10
3.3.1.	Formação de hidroxiapatita	14
3.4.	Titânio como material para implantes	16
3.5.	Interação célula-superfície	19
3.6.	Modificações de superfície	19
3.6.1.	Deposição por laser pulsado (PLD)	21
4.	Materiais e métodos	24
4.1.	Síntese do Biovidro Niobo-fosfato	24
4.1.1.	Alvos	26
4.1.2.	Preparo dos substratos	27
4.1.3.	Técnica de deposição dos filmes de biovidro	28
4.2.	Técnicas de caracterização	29
4.2.1.	Fluorescência de raios X	29
4.2.2.	Microscopia eletrônica de varredura	29
4.2.3.	Espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS)	30
4.2.4.	Difração de Raios X	31
4.2.5.	Teste de risco	31
4.2.6.	Perfilometria	32
4.2.7.	Microscopia de força atômica (AFM)	33
4.2.8.	Determinação de ângulo de contato	33
4.3.	Ensaio <i>in vitro</i>	34
4.3.1.	Cultura de células	34
4.3.2.	Proliferação celular	34

4.3.3.	Contato focal.....	35
5.	Resultados e discussão	36
5.1.	Caracterização do Vidro Bioativo contendo Nióbio	36
5.2.	Caracterização do Alvo de Biovidro contendo Nióbio	39
5.3.	Caracterização dos Filmes.....	44
6.	Conclusão	60
7.	Sugestões para trabalhos futuros	61
8.	Referencias bibliográficas	62

1. Introdução

Ao longo dos anos, o avanço da medicina tem contribuído para um aumento da longevidade da população. Associado a esse envelhecimento, ocorre um comprometimento e até mesmo a perda de função de diversos órgãos e tecidos do corpo. Para contornar os problemas decorrentes de tais perdas, surgem os implantes, desenhados para devolver aos pacientes características estéticas e funcionais dos órgãos afetados.

A utilização de implantes como substitutos dentais não é um conceito novo. Os primeiros relatos de implantes odontológicos surgiram há 4000 anos com os chineses, que substituíam os dentes perdidos por pedaços de bambu fixados nos ossos maxilares. Os avanços da engenharia de materiais e da medicina conduziram à descoberta e ao desenvolvimento de diversos outros biomateriais para implantes. Recentemente, a partir de estudos com tíbias de coelho, foi descoberta a capacidade do tecido ósseo de responder positivamente a estímulos induzidos pela superfície dos implantes de titânio e assim, formar ligações químicas na interface, tornando esse metal um forte candidato ao uso em implantes, e cunhando pela primeira vez o conceito de osteointegração (BRANEMARK *et al.*, 1969).

O titânio comercialmente puro é hoje o material mais usado para implantes odontológicos. O sucesso da sua aplicação está associado à combinação de suas propriedades mecânicas e biocompatibilidade (TANASKOVISC *et al.*, 2007). Apesar de excelentes características, sabe-se hoje que implantes de titânio apresentam apenas ancoragem mecânica ao tecido ósseo, não fazendo ligação química direta entre material e tecido adjacente. A falta de adesão direta entre o osso e o material pode levar a um espaçamento na interface, que está sujeito à formação de um tecido fibroso circundando a superfície do implante, podendo ocasionar falhas.

Inúmeras modificações de superfície têm sido pesquisadas buscando aperfeiçoar propriedades da superfície dos implantes de titânio. Como uma das possíveis soluções aos problemas encontrados, temos os recobrimentos, que vêm para modificar a superfície dos implantes, conferindo a elas novas propriedades. Esses podem ser cerâmicos bioativos, como os biovidros e a hidroxiapatita, que surgem como uma alternativa bastante interessante, uma vez que são semelhantes à fase mineral do osso e promovem assim ligações químicas diretas entre os tecidos e o material, proporcionando melhor adesão e melhor estabilidade desses implantes.

O presente trabalho aborda da deposição de vidros bioativos sobre substratos de titânio comercialmente puro por deposição a laser pulsado. O biovidro escolhido possui uma composição que não contém sílica, é baseado em fosfato e tem a adição de óxido de nióbio, que ajuda no aumento de propriedades mecânicas e compatibilidade celular. Os filmes foram avaliados quanto à sua morfologia, às suas propriedades mecânicas e às respostas aos ensaios *in vitro*. O trabalho visa à formação de uma superfície biocompatível e bioativa, com resposta celular superior à do titânio sem tratamento de superfície.

2. Objetivos

Objetivo Principal:

- Produzir filmes de biovidro niobo-fosfato;

Objetivos Secundários:

- Obter por vias de síntese o vidro bioativo contendo nióbio;
- Dominar a técnica de deposição de recobrimentos de biovidro por deposição por laser pulsado (PLD);
- Verificar se ocorreu transferência de estequiometria do alvo para os filmes, como indica a literatura da técnica;
- Avaliar as resposta celulares quando em contato com os filmes obtidos.

3. Revisão bibliográfica

Neste capítulo serão apresentados os tópicos relevantes para a contextualização e entendimento do tema. Fazendo uma breve revisão sobre tecido ósseo, biomateriais, modificação na superfície de implantes, técnicas de deposição e vidros bioativos.

3.1. Tecido ósseo

O tecido ósseo é um importante constituinte do corpo humano, desempenhando funções como sustentação e suporte dos tecidos moles, proteção dos órgãos e função endócrina, além de ser uma importante reserva de minerais, como o cálcio e o fósforo presente no organismo (ALBERTS *et al.*, 2010). Além de propriedades mecânicas fundamentais para o desenvolvimento da sua função, o tecido ósseo apresenta grande capacidade de regeneração. Desta forma, é considerado um tecido dinâmico que se encontra em constante processo de remodelação e regeneração, de acordo com as tensões que são aplicadas sobre este durante o seu desenvolvimento.

Macroscopicamente, os ossos são compostos por duas partes. A camada mais externa é o osso cortical, que possui um aspecto mais denso e compacto. A parte mais interna é denominada de osso esponjoso, é formada por trabéculas ósseas delgadas e possui função metabólica. Histologicamente, não há diferenças entre o osso cortical e o trabeculado, compostos pelas mesmas estruturas – células ósseas e a matriz óssea calcificada.

A estrutura mineralizada de tecido ósseo é envolta em uma fina camada de tecido conjuntivo, que, por sua vez, é formada uma camada interna chamada de perióstio e uma externa, chamada de endóstio. Esse tecido é formado por células osteoprogenitoras, fibras colágenas e é rico em vascularização, sendo assim fundamental para processos como o reparo ósseo. (ROSS e ROWRELL, 1993)

As células que compõem o tecido ósseo têm funções como formação, reabsorção e manutenção dos tecidos. Os três principais tipos celulares são: i) os osteoblastos, que se encontram na superfície do osso e são responsáveis pela síntese da parte orgânica da matriz óssea e pela mineralização dessa matriz; ii) os osteoclastos, que são células gigantes e móveis, responsáveis pela reabsorção óssea; e iii) os osteócitos, que são células achatadas, localizadas nas lacunas de onde partem os canalículos. Apesar de possuírem pouca atividade sintética, os osteócitos em estágio maduro são fundamentais para a manutenção da matriz extracelular (JUNQUEIRA e

CARNEIRO, 1995). O aspecto histológico dessas células pode ser observado na Figura 3.1.

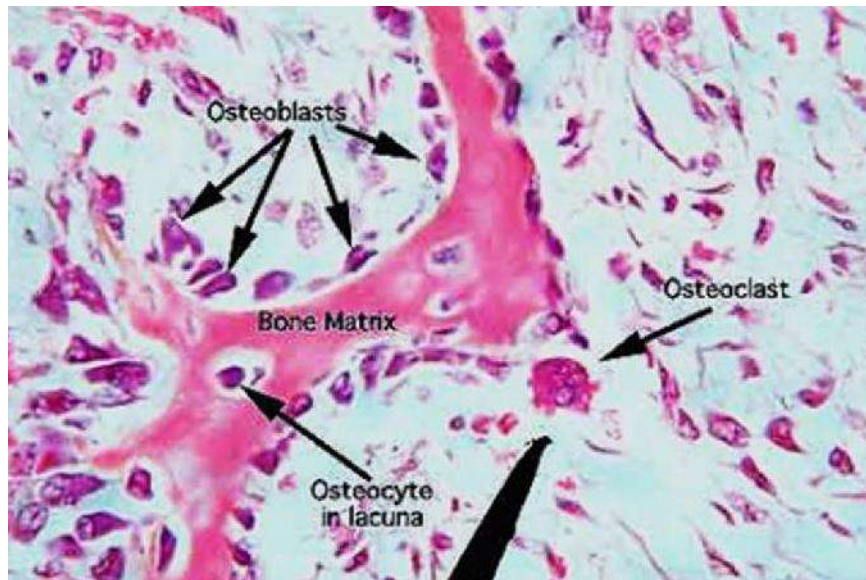


Figura 3.1: Microscopia óptica em uma região de recalcificação.

O tecido ósseo tem como composição, aproximadamente, 33% de matriz orgânica, onde 28% são colágenos do tipo I e os outros 5% são proteínas não colágenas, como osteocalcinas, proteína morfогênica óssea, osteonectinas, entre outras. Os 67% restantes da composição da matriz são a parte inorgânica composta por cristais de hidroxiapatita (CATE, 1985). A Figura 3.2 mostra esquema da composição do tecido ósseo (CATE *et al.*, 1994).

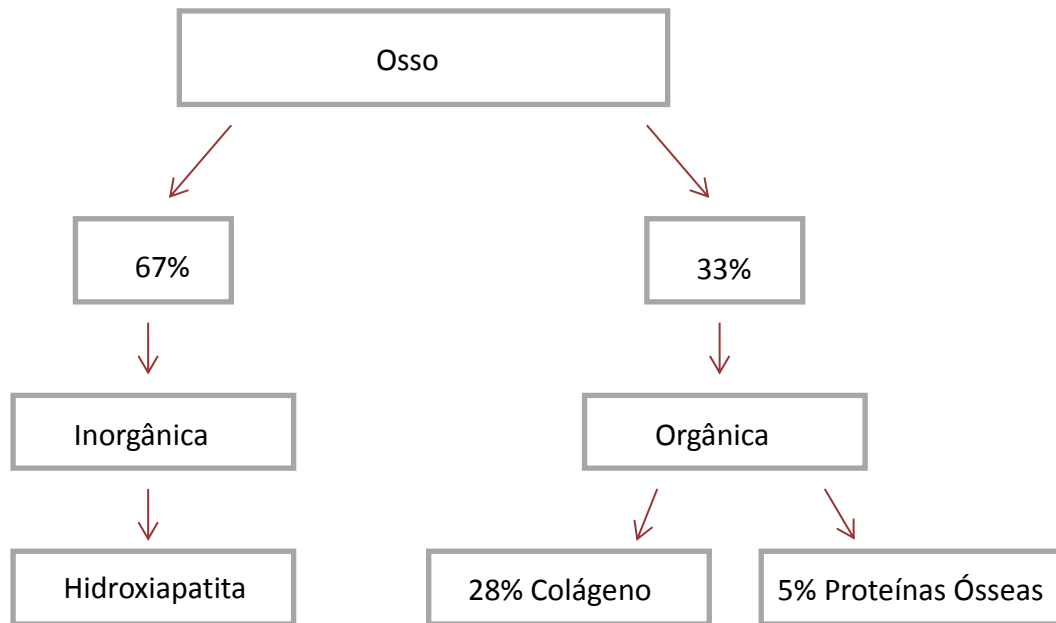


Figura 3.2: Composição do tecido ósseo (adaptado de CATE *et al.*, 1994)

O tecido ósseo é dinâmico e está em constante processo de remodelação. Para que este processo ocorra é essencial um suporte mecânico adequado e um suprimento vascular de grande alcance. No desenvolvimento de tecidos ósseos, conceitos como crescimento (aumento do comprimento e da largura dos ossos), modelamento (aposição ou reabsorção do osso para um formato adequado) e remodelamento (renovação do osso, sem mudar a sua forma) são importantes para o entendimento dos mecanismos decorrentes. (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995)

O potencial de regeneração e recuperação do tecido ósseo é superior aos demais tecidos, uma vez que o tecido recupera as suas características originais. Para a manutenção das suas qualidades e características, o processo de remodelamento é fundamental. Este consiste no recrutamento de osteoclastos responsáveis por reabsorver o tecido ósseo, dando origem a uma cavidade. Passada a fase de reabsorção, os osteoclastos sofrem apoptose, enviando sinais para os osteoblastos, que serão recrutados até a região e irão desempenhar a função oposta, começando a sintetizar matriz extracelular, causando nesta o processo de mineralização. Esta aposição e a reabsorção óssea são controladas por fatores hormonais e locais, que fazem a ativação das células (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

As respostas às cirurgias de implante ou aos procedimentos que fazem a manipulação de tecido ósseo levam em consideração fatores como a extensão das

lesões, a interação entre o biomaterial e a área afetada, a saúde sistêmica do paciente, a resposta inflamatória e a quantidade de tecido necrótico que irá se formar depois da fase cirúrgica do processo. Cada um destes fatores irá determinar o resultado no processo de regeneração e reparo ósseo.

3.2. Biomateriais

Constantes avanços nas áreas de engenharia e das ciências biológicas têm proporcionado melhoras na qualidade de vida da população. A interdisciplinaridade das diferentes áreas tem permitido o desenvolvimento de biomateriais, tanto naturais como sintéticos, que possam manter, reparar, regenerar e até substituir órgãos e funções perdidas ao longo da vida do paciente.

O conceito de biomateriais está em constante mudança, de acordo com o desenvolvimento das áreas. SEPÚLVEDA e PANDOLFELLI (1999) definem biomaterial como:

Um material de origem biológica ou sintética, que não seja droga e que apresente propriedades físicas, químicas e biológicas adequadas, utilizado como suporte temporário de células e tecidos, para confecção de implantes, aparelhos ou sistemas de forma a reparar, regenerar ou mesmo substituir funções de órgão ou tecidos do corpo humano. (SEPÚLVEDA e PANDOLFELLI, 1999)

Segundo OLIVEIRA e NANJI (2004), idealmente um biomaterial deve induzir uma resposta de cicatrização rápida, previsível e controlada. Um bom biomaterial precisa estimular o meio em que está inserido a responder positivamente aos seus estímulos (PFEIFFER *et al.*, 2003). Para que esta resposta seja possível, os biomateriais para implantes devem apresentar alguns pré-requisitos, que de acordo com TENGVALL e LÜNDSTROM (1992), são:

- Não apresentar citotoxicidade;
- Boa biocompatibilidade, que consiste na habilidade do material de induzir uma resposta favorável, envolvendo o menor número de reações inflamatórias, alérgicas ou tóxicas, quando em contato com as células vivas e os fluidos corporais (HENCH, 1998);
- Biofuncionalidade, o conceito que estabelece a importância do material desempenhar a função na qual foi empregado com êxito, sendo essa estática ou dinâmica (RAVAGLIOSO e KRAJEWSKI, 1992);

- Bioadesividade, os biomateriais devem ter propriedades que estimulem a adesão, proliferação e diferenciação celular;
- Fácil esterilização;
- Prevenção da adesão bacteriana na superfície, para evitar posteriores infecções e assim comprometimento e falha dos implantes;
- Textura superficial, uma vez que já foi demonstrado que alterações macro e microgeométricas e alterações na rugosidade superficial, influenciam no comportamento celular (ELIAS e MEIRELLES, 2010).

O conhecimento destes conceitos e pré-requisitos é fundamental para o entendimento, na prática, das importantes propriedades e exigências que se tem no desenvolvimento de um biomaterial. A escolha de um biomaterial depende de uma série de fatores, entre eles a sua aplicação, dado o seu papel de estimular respostas biológicas sem apresentar características nocivas para o seu hospedeiro. (PFEIFFER *et al.*, 2003)

HENCH (1991) e WILSON (1997) demonstraram que nenhum material é completamente inerte, visto que, quando em contato com fluidos e tecidos, eles provocam algum tipo de resposta no hospedeiro. Todavia, biomateriais podem ser classificados como bioinertes, biorreativos, bioativos e biorreabsorvíveis, de acordo com a resposta biológica que eles provocam nos tecidos adjacentes (SILVA, 1999).

São considerados materiais bioinertes os biomateriais que não induzem nenhum tipo de resposta celular significativa, ou seja, são materiais que mantêm as suas propriedades estruturais durante longos períodos. Materiais biorreativos são os que, quando estimulados ou modificados, podem adquirir propriedades para se tornarem bioativos, como a alteração da camada de óxidos na superfície dos implantes ao interagirem com o corpo (KOKUBO e YAMAGUCHI, 2010).

Para os materiais classificados como bioativos, tem-se a introdução do conceito de bioatividade. Ela consiste na interação entre o biomaterial e o tecido, a fim de induzir uma resposta para a regeneração e crescimento tecidual. Materiais bioativos buscam mimetizar estruturas presentes no organismo, induzindo assim respostas celulares específicas, originando ligações químicas diretas entre o tecido e a superfície do material implantado e o crescimento tecidual (WILLIAMS, 1986), essa propriedade permite que o tecido ósseo faça ligação com o material, sugerindo assim a formação de uma osteointegração verdadeira (SHOEDER *et al.*, 1997).

Os materiais bioabsorvíveis fazem parte de uma geração mais atual de biomateriais. Sofrem degradação, solubilização ou fagocitose depois de um determinado período de tempo no organismo, permitindo a sua substituição por tecido neoformado. De acordo com STACY *et al.* (1989), a taxa de degradação deve estar relacionada com a taxa de formação do novo tecido para permitir uma substituição gradual, transferindo assim progressivamente a tensão para o tecido em recuperação.

Uma classe importante de biomateriais são os materiais biocerâmicos, que conjugam boas propriedades de materiais cerâmicos com as características de atividade celular dos biomateriais. A Tabela 3.1 traz exemplos de biocerâmicos discriminados quanto à sua resposta celular.

Tabela 3.1: Tipos de cerâmicos usados para reparos ósseos. (KAMITAKAHARA *et al.*, 2008)

Tipo	Exemplo
Cerâmicos bioinertes	Alumina sinterizada (Al_2O_3), zircônia sinterizada (ZrO_2)
Cerâmicos bioativos	Bioglass®, hidroxiapatita sinterizada, Cerabone®, Ceravital®
Cerâmicos biorreabsorvíveis	B-TCP sinterizado

Os materiais cerâmicos constituem uma extensa classe de materiais. WILLIAMS (1986) definiu os biocerâmicos como “cerâmicas utilizadas na reparação e reconstrução de partes do corpo danificadas ou doentes”. Outra definição de biocerâmicas encontra-se na norma ISO/ TR 10993-9 (1994), que as descreve como materiais cerâmicos projetados para atingir um comportamento específico ao serem usados como implantes, próteses ou órgão artificiais internos. Estes têm sido importantes aliados para regeneração, reconstrução e reparo dos tecidos ósseos nas últimas décadas, uma vez que, no geral, apresentam características químicas e cristalográficas semelhantes ao tecido, melhorando consequentemente a qualidade de vida da população. As respostas clínicas ideais das biocerâmicas necessitam de estabilidade da interface tecido-material e de comportamento mecânico compatível com o tecido substituído (HENCH e BEST, 2004).

Inicialmente, buscava-se que o material causasse a menor resposta possível nos tecidos em que estão inseridos porque se acreditava respostas inflamatórias locais comprometeriam as atividades celulares de reparo da região. Com o desenvolvimento da pesquisa nesta área e o avanço do conhecimento, surgiu como proposta a utilização de um material que fosse bioativo (ZAVAGLIA, 1993). O conceito de cerâmico bioativo foi introduzido no início dos anos 70, como o material capaz de provocar reações para a neoformação tecidual e com isso, aumentar a capacidade de realizar ligação química direta com o tecido ósseo em que está inserido. Segundo HENCH e POLAK (2002), os cerâmicos bioativos podem ser portadores de osteoprogenitores, atuando assim diretamente na recuperação e regeneração óssea.

Atualmente, as cerâmicas mais utilizadas com biomateriais são a alumina, a zircônia, os fosfatos de cálcio, as vitrocerâmicas e os vidros bioativos. Esses últimos são vidros que passam por modificações de superfície, tornando-a bioativada e responsável por induzir, a partir de trocas iônicas com os fluidos e tecidos a formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada, que irá formar ligações químicas fortes com os tecidos adjacentes (MACHADO, 2007).

3.3. Vidros bioativos

Os vidros bioativos surgiram no início da década de 70, quando o professor Larry Hench e seus colaboradores criaram em laboratório uma composição de vidro no sistema $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$, capaz de fazer adesão química forte com o osso adjacente. (HENCH *et al.*, 1971 e SILVA *et al.*, 2008)

HENCH *et al.* (1971) estabeleceram a composição específica do biovidro denominado 45S5 como sendo 45% de SiO_2 , 24,5% de Na_2O , 24,5% de CaO e 6% de P_2O_5 , hoje comercialmente conhecido como Bioglass® e/ou Perioglass®. O diagrama de fases proposto por Hench está representado na Figura 3.3 e indica as possíveis composições dos vidros bioativos do sistema $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$. A composição do vidro bioativo 45S5 tem alta biocompatibilidade e variações desta alteram as características de bioatividade, biorreabsorção e reposta celular. (CHEN *et al.*, 2006)

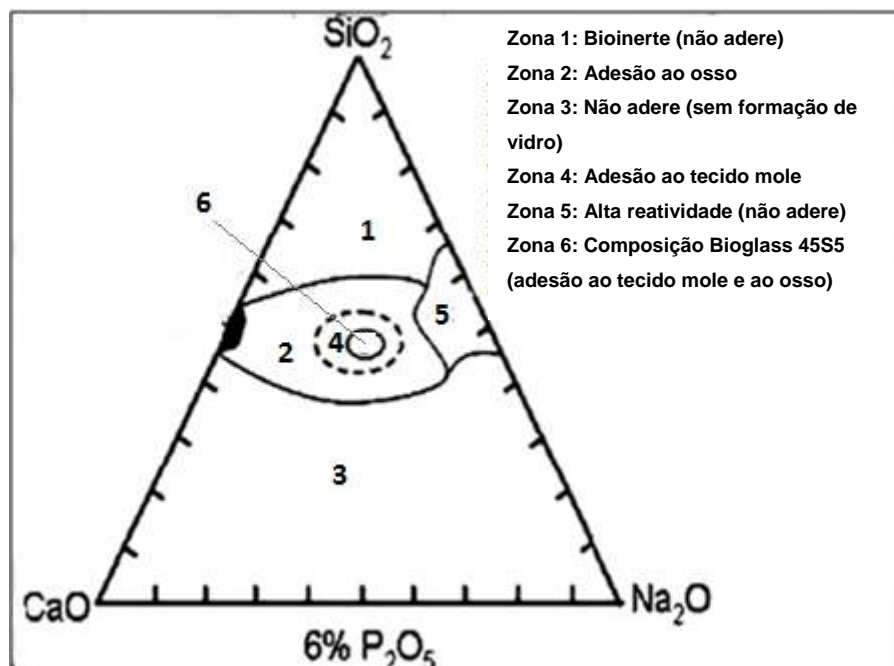


Figura 3.3: Diagrama ternário proposto por Hench (Adaptado de HENCH, 2006).

A partir do diagrama de fase mostrado na Figura 3.3 observa-se que composição do vidro 45S5 representado pela zona 6, que está contida tanto na zona 2 como na 4, sugerindo assim que o biovidro faz ligação não só com o tecido ósseo, mas também com os tecidos moles adjacentes à região onde este biomaterial foi implantado. KOKUBO e TAKADAMA (2006) associaram essa interação à camada de hidroxiapatita carbonatada formada pelo material quando em contato com os fluidos corpóreos ou o SBF. Os mecanismos de formação da hidroxiapatita carbonatada serão mais bem elucidados na seção 3.3.1 deste trabalho.

Alguns fatores na composição estrutural dos biovidros são fundamentais para que haja bioatividade associada ao material. Entre eles estão a quantidade de SiO_2 inferior a 60% mol (BERBECARU *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2013), altos valores de CaO e Na_2O e uma elevada razão Ca/P (CARBONARI, 2004).

Além da capacidade de adesão rápida ao tecido ósseo adjacente, este biomaterial apresenta outras características que o tornam uma excelente opção para regeneração e reparo ósseo. Destacam-se a alta biocompatibilidade testada tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ANDRADE *et al.*, 2006), sem a presença de tecido fibroso na interface; uma superfície favorável para a rápida nucleação e crescimento de uma camada de hidroxiapatita carbonatada (HAc), conferindo a bioatividade e favorecendo sua

interação com o osso e sua capacidade de biorreabsorção, deixando apenas a forte ligação entre o implante e o tecido neoformado.

O biovidro, quando colocado em um ambiente cujas condições simulem as características fisiológicas de dissolução, tem o potencial de ativar os genes de controle da osteogênese e da produção de fatores de crescimento (XYNOS *et al.*, 2000), promovendo a diferenciação celular das células mesenquimais em osteoblastos (AMARAL *et al.*, 2002) e levando a um aumento de neoformação óssea na região (WHEELER *et al.*, 1998). Em seu trabalho, CROVACE *et al.* (2010) mostram a formação de uma camada de hidroxiapatita carbonatada em arcabouços de biovidro, quando imerso em SBF durante diferentes intervalos de tempo, como pode ser observado na eletromicroscopia representada na Figura 3.4.

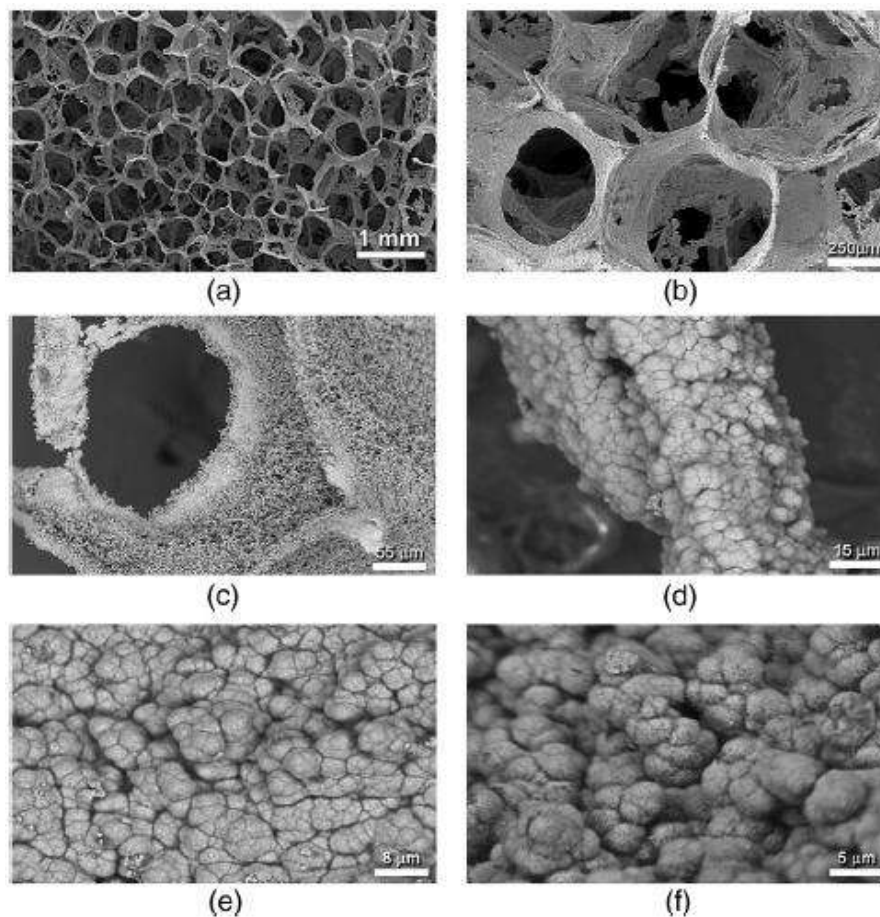


Figura 3.4: Eletromicrografia (MEV) de (a,b) arcabouços de Biosilicate®, (c) imerso em SBF durante 1 dia, (d) 3 dias, (e) 7 dias, (f) 10 dias. (CROVACE *et al.*, 2016 – com autorização)

Embora a hidroxiapatita sintética seja o biocerâmico mais utilizado comercialmente, os vidros bioativos apresentam uma série de vantagens. Segundo ANDERSSON *et al.* (1995), a camada de hidroxiapatita carbonatada formada na superfície dos biovidros, quando comparada com a hidroxiapatita sintética, apresenta maior similaridade em termos de cristalinidade com a hidroxiapatita biológica dos tecidos, além de proporcionar maior crescimento e produção de osso trabecular. (DUCHEYNE e QIU, 1999)

De acordo com estudos realizados por MARTINS *et al.* (2004), FU *et al.* (2008) e GOEL *et al.* (2012), os vidros bioativos podem ser considerados tanto osteocondutor, dando suporte para o crescimento de tecido na região de interface, como também osteoindutor, estimulando o crescimento de tecido ósseo em regiões onde não há presença de osso adjacente. Outras importantes características incluem o aumento da revascularização da área acometida, o estímulo à atividade enzimática e a possibilidade da adesão de osteoblastos (KAUR *et al.*, 2013). Por outro lado, entre as desvantagens deste biomaterial estão algumas características inerentes aos materiais cerâmicos, como baixa tenacidade à fratura, baixa resistência à flexão e baixa resistência à fratura, o que limita seu uso em aplicações e regiões onde o material seja exposto a grandes tensões.

A fim de melhorar algumas propriedades dos vidros bioativos, grupos de pesquisadores adicionaram diversos elementos, modificando assim a composição inicial. Entre os elementos adicionados estão magnésio (SABOORI *et al.*, 2009), zinco (LANG *et al.*, 2007) e o nióbio. O nióbio forma uma camada de pentóxido de nióbio ao entrar em contato com o oxigênio (ROCHA, 2014) e é considerado biorreativo, além de melhorar o espalhamento celular e aumentar a atividade de fibronectina e osteopontina (OSATHASON *et al.*, 2006). Quanto à resposta biológica dos materiais, o nióbio é classificado como elemento de baixa citotoxicidade (TAMAI *et al.*, 2007), alta biocompatibilidade e com potencial osteoindutor (KUSHWAHA *et al.*, 2012; OBATA *et al.*, 2012; LEITUNE *et al.*, 2013 e FOOLADI *et al.*, 2013). Estudos feitos por KUSHWAHA *et al.* (2012), FERNANDES *et al.* (2012) e DENRY *et al.* (2008), confirmaram que a presença de óxido de nióbio na estrutura dos vidros bioativos aumenta a biocompatibilidade e promove a bioatividade do material.

OBATA *et al.* (2012) realizaram testes *in vitro* de vidro bioativos com diferentes concentrações de pentóxido de nióbio e sugerem que a incorporação deste está associada ao aumento de função dos osteoblastos. Compostos de biovidro com nióbio (BgNb) têm significativo aumento da atividade de fosfatase alcalina e da calcificação

dos tecidos por osteoblastos (TAMAI *et al.*, 2007 e FERNANDES *et al.*, 2012). Sendo assim, há uma proporção entre a concentração de nióbio dissolvido no meio e o reparo ósseo efetivo. (LIMA *et al.*, 2011)

Segundo SILVA *et al.* (2008), a adição de nióbio na composição dos vidros bioativos promove boa estabilidade térmica e resistência química, além de melhorar as propriedades mecânicas (CARBONARI *et al.*, 2012; SENE *et al.*, 2004). O módulo de elasticidade do material aumenta proporcionalmente à quantidade de óxido de nióbio presente na estrutura, uma vez que a presença deste melhora propriedades estruturais e, conseqüentemente, aumenta a resistência à deformação (SENE *et al.*, 2004).

3.3.1. Formação de hidroxiapatita

Segundo HENCH (1991), a camada de hidroxiapatita carbonatada neoformada na superfície dos vidros bioativos mimetiza características químicas e cristalográficas do osso, permitindo ligação química entre a camada e o tecido ósseo adjacente. De acordo com SHAPOFF *et al.* (1997), o processo de ligação do biovidro com o osso é fortemente dependente da capacidade de reação química do material quando em contato com fluidos teciduais, pois é esta reatividade que permite a formação de hidroxiapatita carbonatada (HAc) na superfície do material. (JONES *et al.*, 2013)

A osteogênese está relacionada com a dissolução de produtos componentes do vidro em células osteogênicas, estimulando assim uma neoformação óssea (HENCH e POLAK, 2002). Segundo JONES *et al.* (2013), a camada de hidroxiapatita carbonatada formada promove uma superfície adequada para a adesão e a proliferação de células osteogênicas.

HENCH e ANDERSSON (1993), CLARK *et al.* (1976) e HENCH (1991) propõem diferentes etapas para explicar o mecanismo de formação de HAc na superfície dos biovidros. São elas:

1. Rápida permuta de cátions, como Na^+ , K^+ e Ca^+ com H^+ e H_3O^+ , entre o vidro e a solução, criando também ligações de silanol (Si-OH) na superfície do vidro. Esta etapa é controlada pela difusão e tem dependência com o tempo.



Observa-se um aumento do pH da solução, junto com um aumento do teor de sílica e um empobrecimento de cátions.

2. Perda da sílica solúvel do vidro para a solução. Os altos valores de pH local levam ao ataque da rede vítrea por hidroxilas (OH)⁻, provocando a quebra das ligações entre Si-O-Si. A sílica solúvel é perdida na forma de Si(OH)₄, formando mais silanol (Si-OH) na interface solução-vidro. Esta etapa é controlada pelas reações interfaciais e exibem relações diretas com o tempo.



3. Condensação de grupos Si-OH próximo à superfície dos vidros e repolimerização da camada rica em sílica.
4. Migração de grupos Ca⁺² e PO₄⁻³ do vidro para a superfície, através da camada rica em SiO₂, formando assim um filme amorfo rico em CaO-P₂O₅.
5. Incorporação de hidroxilas (OH)⁻ e carbonato da solução e cristalização da camada de filme amorfa rica em CaO-P₂O₅ para HAc.
6. Adsorção de proteínas específicas na camada de SiO₂-HCA.
7. Ação de macrófagos.
8. Adesão e diferenciação celular.
9. Formação de matriz extracelular.
10. Mineralização da matriz.

Podem-se dividir as etapas em duas partes: de 1-5, onde as reações acontecem na interface material/fluido e dependem apenas da composição dos vidros bioativos, e 6-10, que dependem de interações com o tecido. As reações de 1-5 podem ser observadas na Figura 3.5.

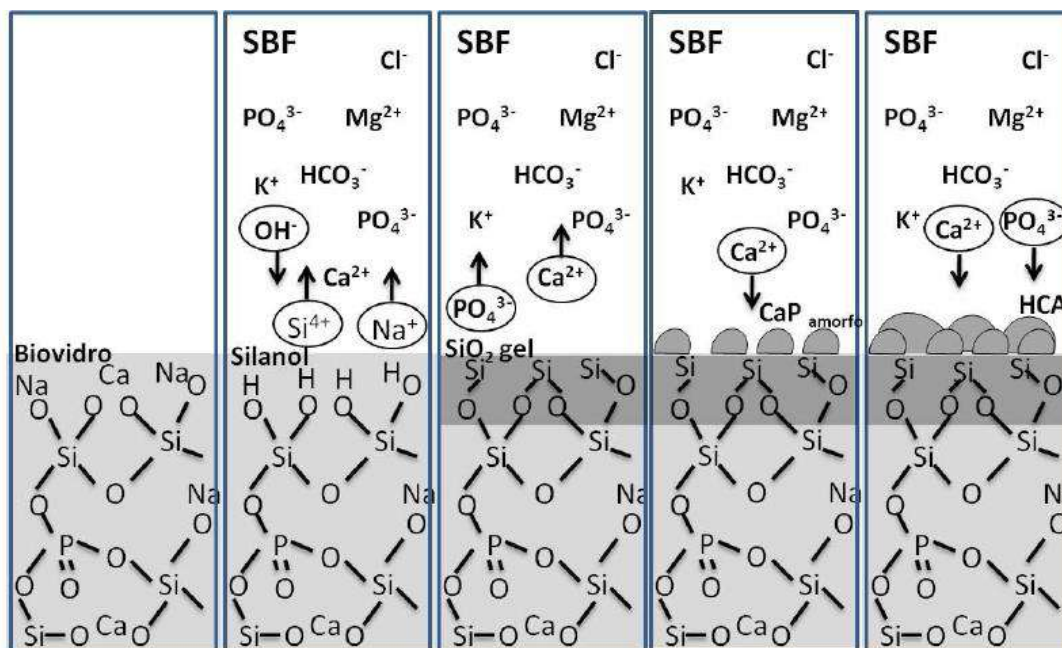


Figura 3.5: Representação esquemática da formação de HAc (KOKUBO *et al.*, 2003 – com autorização)

Entre as etapas 1, 2 e 3 surgem fases precursoras da hidroxiapatita, os quais aparecem precipitados. Estes precipitados são responsáveis pela nucleação e cristalização da hidroxiapatita. (DAGUANO *et al.*, 2011)

3.4. Titânio como material para implantes

Ao longo dos anos e dos avanços nas áreas médicas e de biomateriais, uma imensa variedade de materiais tem sido testada e desenvolvida a fim de recuperar estruturas e funções perdidas. Para serem utilizados como implantes, é fundamental que apresentem algumas características, como biocompatibilidade, biofuncionalidade, capacidade de realizar osteointegração entre a superfície do material e o osso e viabilidade clínica. Entre as classes de biomateriais utilizadas, os metais são uma excelente escolha, por associar boa biocompatibilidade a propriedades mecânicas ideais para o desempenho da função proposta.

O titânio é um biomaterial já estabelecido e com grande aplicação, disponível como titânio comercialmente puro (Ti-cp) ou ligas de titânio. É o principal material de eleição para implantes médicos e odontológicos, por reunir importantes características como elevada resistência, boa rigidez, módulo de Young compatível com o do osso,

boa resistência à corrosão e biocompatibilidade. Apesar de, durante muitos anos, ter se acreditado que os implantes de titânio eram capazes de ser osteointegráveis, sabe-se hoje que este não é capaz de fazer ligação química direta entre tecido ósseo e biomaterial, ou seja, não são capazes de fazer osteointegração, como pode ser observado na figura 3.6, onde se encontram os tipos de osteogênese de cada material. Segundo EVRARD e PARENT (2010), o titânio não pode ser considerado um material bioinerte, uma vez que, após a sua inserção na cavidade bucal e o contato com os fluidos corporais, é formada uma camada de óxido de titânio (TiO_2) e um encapsulamento fibroso (JONES, 2013), sendo assim considerado um material biorreativo. A corrosão do titânio e a formação deste óxido são fortemente dependentes de características do meio fisiológico e da presença do oxigênio, que é o agente de oxidação da reação.



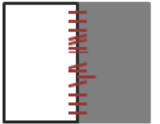
Material	Implante - Tecido	Aparência	Tipo de Osteogênese
Titânio, Óxido de Alumínio, Cerâmicas Bioinertes		Contato entre o osso e a superfície do implante	Osteogênese de Contato
Biovidro, Biocerâmicas, Fosfatos de cálcio e Apatitas (Bioativos)		União química ao osso	Osteogênese de união verdadeira
Titânio com superfície de aspersão		União físico-química ao osso	Osteogênese

Figura 3.6: Tipos de osteogênese na interface tecido-implante dos diferentes materiais. Adaptada de SHOEDER *et al.* (1997).

O conceito de osteointegração foi sofrendo mudanças e adaptações ao longo dos anos. Inicialmente, a osteointegração foi descrita por BRANEMARK *et al.* (1977) como a “ligação direta, estrutural e funcional entre o osso ordenado e vivo e a superfície de um implante sujeito a cargas funcionais”. Em meados dos anos 80, este conceito foi redefinido por Tomas Albrektsson, que apontou que os implantes de titânio puro e/ou

sua ligas não fazem uma ligação direta com o osso adjacente, uma vez que, entre o tecido ósseo e o material, existe uma camada de glicoproteínas; a osteointegração foi então descrita como “o processo pelo qual a fixação rígida e assintomática de um material aloplástico no osso é obtida e mantida durante a função” (ALBREKTSSON, 1985). Histologicamente, a osteointegração é definida como a ancoragem direta de um implante através da formação de tecido ósseo ao seu redor, sem que exista crescimento de tecido fibroso na interface osso-implante. O contato contínuo e completo entre o osso e o implante é praticamente impossível, e até hoje não se chegou a um consenso sobre qual extensão do contato osso-implante é aceitável para o uso de termo osteointegração. Portanto, um implante é considerado osteointegrado quando atende a certos critérios de exigência, como estabilidade, boa cicatrização, ausência de inflamação, entre outros fatores que podem ser avaliados clínica e radiograficamente (DURACCIO *et al.*, 2015).

O protocolo descrito por Branemark, em 1977, divide a colocação dos implantes em duas fases distintas: a cirúrgica, na qual ocorre a instalação do implante, após essa se preconiza esperar de 4 a 6 meses para a colocação da prótese; e a segunda, que é a fase restauradora, onde é realizada a reabilitação protética propriamente dita. Recentemente, o que tem se buscado é transformar estas duas fases em uma só etapa, chamada de carga imediata, que consiste na reabilitação protética em até uma semana após a instalação dos implantes. A dificuldade da implementação total desse protocolo está na imensa variedade de fatores levados em conta, como o tipo e volume de osso onde é colocado o implante e o período de tempo levado para a osteointegração. Por isso, a constante busca por tratamentos de superfície que, além de reduzirem este tempo, permitam uma ligação química entre o osso e o material, possibilita a aplicação de carga imediata em um maior número de casos.

Posterior à colocação do implante tem-se dois diferentes tipos de estabilidade: a primária, que ocorre no primeiro instante e leva em conta fatores locais, características do osso, desenho do implante e a técnica cirúrgica, e a estabilidade secundária, que está relacionada a diversos eventos químicos e celulares que acontecem na interface tecido ósseo-implante.

Segundo ALBREKTSSON *et al.* (1986), o sucesso da osteointegração depende de diversos fatores, incluindo a saúde sistêmica e oral do paciente, hábitos viciosos, qualidade óssea, contaminação bacteriana, carga imediata e características da superfície do implante.

3.5. Interação célula-superfície

A biocompatibilidade de um material está intimamente relacionada com a resposta celular em sua superfície. As células, quando em contato com a superfície do substrato, são capazes de responder a estímulos do meio externo que influenciam diretamente em sua adesão, proliferação e diferenciação (ANSELME, 2000; ANSELME e BIRELLE, 2005). O entendimento dos mecanismos que influenciam o comportamento celular é importante para o aperfeiçoamento de características de superfície de futuros implantes. A interação célula-material envolve diversos fenômenos, que podem ser divididos em três etapas: (i) adsorção, adesão e espraiamento celular; (ii) migração e proliferação; (iii) diferenciação celular. A primeira destas etapas é importante por determinar a qualidade dos fenômenos seguintes. (SANTOS, 2008)

Materiais que apresentam características físico-químicas semelhantes às da matriz extracelular têm melhor interação com os tecidos, promovendo a adesão, migração e diferenciação celular, e conseqüentemente, o crescimento de tecido na região em que foram implantados.

3.6. Modificações de superfície

Modificações de superfície são realizadas a fim de melhorar as respostas biológicas na interface implante - tecido ósseo. Estas modificações levam a uma organização celular, promovendo a migração, diferenciação e a proliferação das células do tecido. Entre as mais comuns estão a formação de rugosidade e recobrimentos. A primeira tem o objetivo de aumentar a área de contato e, conseqüentemente, melhorar as respostas celulares e a segunda, tem como objetivo associar diferentes propriedades, de diferentes tipos de material. BAUER *et al.* (2013) apontam como métodos de produção de rugosidade mais utilizados a anodização, técnica de *plasma spray*, jateamento de partículas cerâmicas e ataque ácido. Por meio de recobrimentos, é possível produzir um material que apresenta determinadas propriedades volumétricas aliadas a características superficiais que não seriam, a princípio, compatíveis.

Recobrimentos cerâmicos em implantes metálicos podem servir de exemplo para compreender as vantagens da aplicação dos recobrimentos, pois fazem a associação de propriedades mecânicas do *bulk* com propriedades da superfície. Como os metais são materiais bioinertes, isto é, não fazem ligação química estável com o tecido ósseo

circundante, os recobrimentos de cerâmicos bioativos foram desenvolvidos com o objetivo de melhorar a relação na interface material-tecido, levando à formação de uma ligação química direta nessa região, como pode ser observado na Figura 3.7.

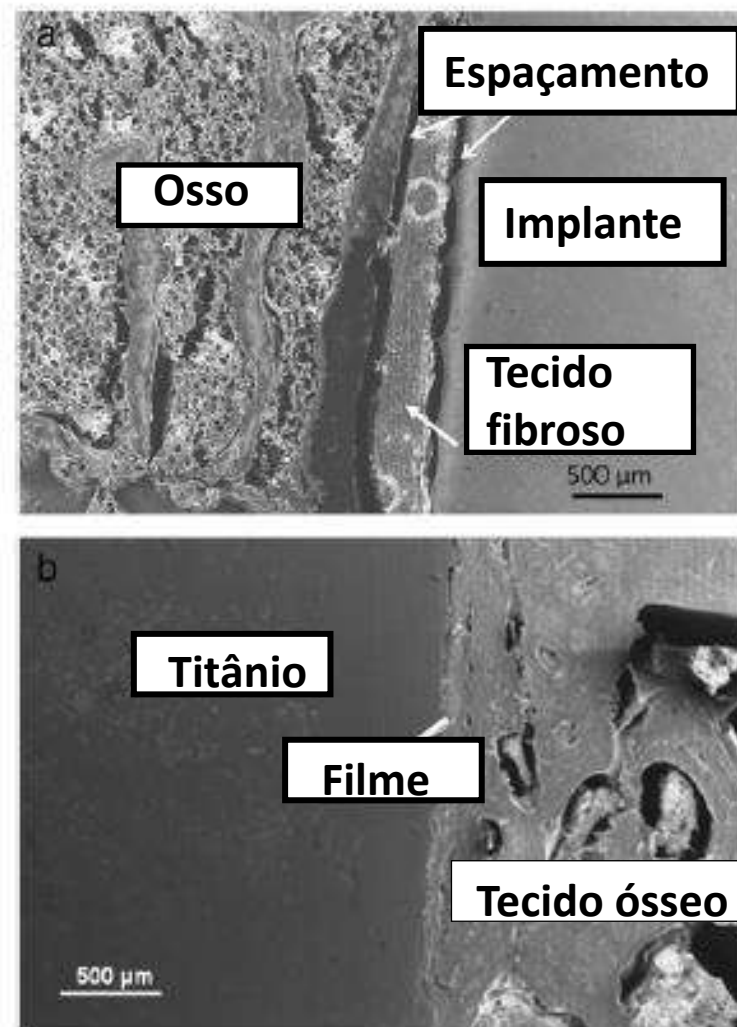


Figura 3.7: Microscopia Eletrônica de Varredura de implantes em tecido ósseo, onde (a) resposta de um material bioinerte com a formação de um tecido fibroso com espaçamento na interface tecido-material e (b) reposta de um material bioativo, caracterizada pela ligação química do osso circundante ao recobrimento. (HEIMAN, 2013 – com autorização)

Quando aplicados como recobrimentos para implantes, os biocerâmicos melhoram propriedades de superfície, como adesão e molhabilidade, previnem a liberação de íons provenientes da corrosão excessiva, diminuem a contaminação do processo de fabricação da peça, além de produzirem uma superfície porosa que facilita a adesão e

proliferação celular. De acordo com DE GROOT (1998), recobrimentos de cerâmicas bioativas em superfícies de metais bioinertes proporcionam uma interação física adequada entre a superfície do implante e o tecido ósseo.

3.6.1. Deposição por laser pulsado (PLD)

Diferentes técnicas de recobrimento têm sido utilizadas para a produção e o desenvolvimento de filme de biovidros, estando entre as mais exploradas o *sputtering*, *plasma spraying* e sol-gel (LISTE *et al.*, 2004). D'ALESSIO *et al.* (1999) e SERRA *et al.* (2001) apontaram a técnica de deposição por laser pulsado (PLD) como uma excelente candidata para a deposição de vidros bioativos, por permitir que a espessura desejada seja atingida e por oferecer melhor adesão entre filme e substrato quando comparadas as outras técnicas. (MA *et al.*, 2013)

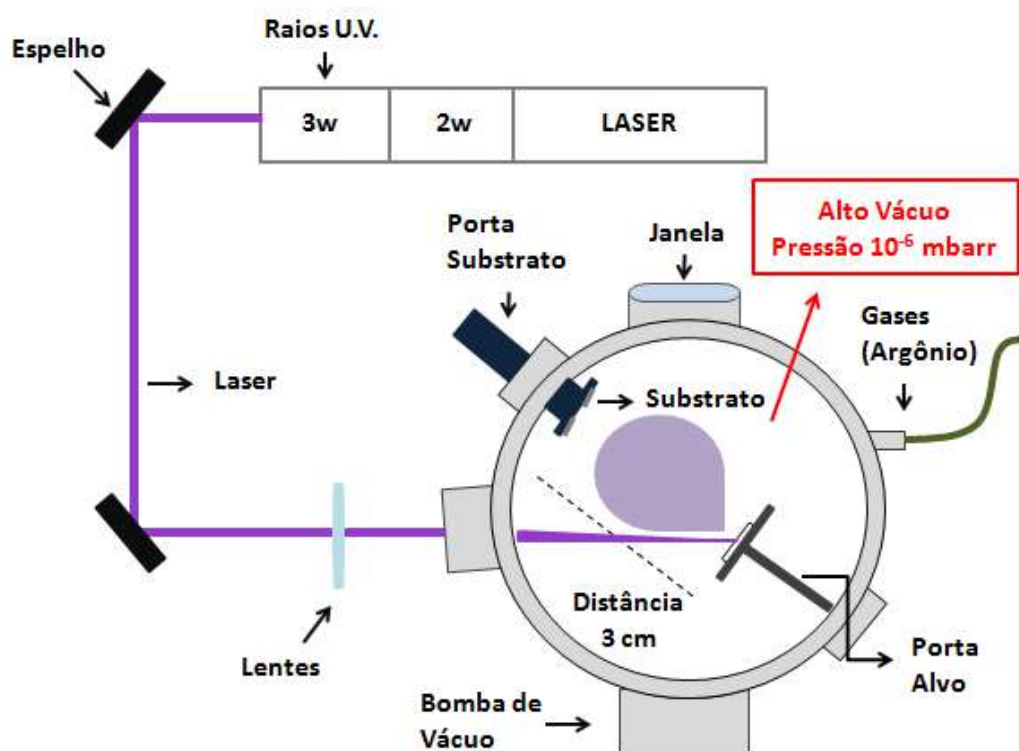


Figura 3.8: Esquema de uma câmara de deposição por PLD.

O PLD é um tipo de deposição física a vapor realizada em atmosfera controlada. O esquema da Figura 3.8 representa uma câmara de deposição por PLD, onde um laser

de alta energia é focalizado em um ponto de um alvo composto pelo material a ser depositado, causando a sua ablação. O material arrancado pela ablação é depositado sobre um substrato posicionado à frente do alvo, formando um filme. Neste processo, é utilizado um laser pulsado, no qual a frequência dos pulsos e a energia do laser são controladas para se obter as propriedades desejadas no filme. Lasers com diferentes comprimentos de onda podem ser escolhidos, de acordo com o tipo de recobrimento a ser obtido.

Uma das características mais importantes do PLD é a capacidade de produzir filmes estequiométricos com relação ao alvo. Em um processo convencional de evaporação térmica, os elementos são evaporados de acordo com a sua pressão de vapor, causando uma deposição com estequiometria dependente das pressões de vapor dos constituintes da fonte. No caso do PLD, como a densidade de energia é muito alta, o alvo sofre ablação em vez de evaporação simples, resultando em uma retirada de material que não depende da pressão de vapor. Assim, os filmes depositados por PLD podem ter as mesmas condições estequiométricas que o alvo usado, detalhe fundamental para as respostas biológicas e de bioatividade do recobrimento. LISTE *et al.* (2004) estudaram a transferência estequiométrica do alvo com diferentes composições de vidros bioativos depositados por PLD, a fim de investigar a composição final do filme depositado. Os autores concluíram que o PLD é uma técnica promissora para a produção de recobrimentos com bioatividade, uma vez que se confirmou a transferência da complexa estequiometria do alvo para o filme.

O principal problema dos recobrimentos de biomateriais comercialmente produzidos é que a deposição destes é realizada por *plasma spraying*, e nessa técnica é mais difícil controlar a cristalinidade, a composição, a porosidade e a morfologia da superfície. O PLD é uma alternativa bem sucedida contra esses problemas, produzindo filmes com controle de cristalinidade e com alta aderência ao substrato metálico (NISTO *et al.*, 2004; KATTO *et al.*, 2003; TANG *et al.*, 2012), além de possibilitar o controle da rugosidade de superfície. (RAU *et al.*, 2012)

Outro fator de grande influência são as reações de dissolução do filme e crescimento de tecido ósseo na superfície do material (BERBECARU *et al.*, 2009). Os filmes produzidos por PLD podem ser produzidos com pequena espessura, e se a taxa de dissolução do filme for muito alta, pode-se ter uma reabsorção total do recobrimento e substituição deste por formação de tecido ósseo na região. Segundo KIM *et al.* (2005), a taxa de dissolução é influenciada pela cristalinidade do filme, sendo assim, quanto menor a cristalinidade maior a taxa de dissolução. A forma mais

fácil para fazer o controle da cristalinidade é pela temperatura do substrato, que influencia também na adesão, nos grupos funcionais presentes, na morfologia e no crescimento do filme. (WANG *et al.*, 2014)

Uma vantagem importante do PLD é a possibilidade de se utilizarem alvos com pequenas dimensões, uma vez que o laser é focado em um ponto. Isso é especialmente importante para alvos compostos por materiais caros, onde seria muito dispendioso produzir um alvo grande, como acontece no *sputtering*. No entanto, algumas considerações devem ser feitas a respeito do alvo da ablação a laser no PLD. Em primeiro lugar, o material do alvo deve ter alta absorção de radiação na faixa de comprimento de onda do laser utilizado, uma vez que a energia luminosa deve ser absorvida para que a ablação ocorra. Além disso, é mais interessante ao processo a utilização de materiais que não apresentem alta condutividade térmica, para que a energia seja concentrada em um volume pequeno. Por último, é preferível que alvos cerâmicos tenham alta densidade, para que a formação de material particulado na ablação seja reduzida.

Por fim, as camadas dos recobrimentos de vidros bioativos depositados por PLD são biocompatíveis e bioativas, promovendo uma osteointegração eficiente e apresentando excelentes respostas celulares na superfície (FLOROIAN *et al.*, 2012). O foco dos novos estudos nesta área não tem sido apenas na relação implante-osso, mas também nos problemas associados às características estruturais dos filmes e no aperfeiçoamento dos parâmetros de deposição, que devem ser cuidadosamente selecionados de acordo com a literatura e ajustados experimentalmente.

4. Materiais e métodos

O presente capítulo trata dos materiais e métodos utilizados para o desenvolvimento do trabalho.

4.1. Síntese do Biovidro Niobo-fosfato

A síntese do vidro niobo-fosfato com composição molar de 30% de Nb₂O₅, 30% de P₂O₅, 20% de CaF₂ e 20% de CaO (SILVA, 2008), foi feita a partir da mistura e homogeneização de reagentes químicos fontes de CaF₂, CaO, Nb₂O₅ e P₂O₅, em parceria com o Laboratório de Cerâmicos do IME. A composição escolhida foi eleita por apresentar resultados celulares satisfatórios em trabalho anteriores (FERNANDES *et al.*, 2012; ROCHA *et al.*, 2014), quando comparada com biovidros comerciais.

O Nb₂O₅ e o CaF₂ têm como precursores os próprios reagentes. Sendo assim, suas fontes são o óxido de nióbio (CBMM - 85% de pureza) e o fluoreto de cálcio (Riedel-de Haen – 99% de pureza), respectivamente. A fonte utilizada para a obtenção do P₂O₅ foi o ácido ortofosfórico (MERCK – 85% de pureza), que foi decomposto em anidrido fosfórico e água, de acordo com a reação:



O CaO utilizado é proveniente da decomposição do carbonato de cálcio (MERCK – 99% de pureza), como pode se observar na reação:



Cada reagente foi separado em becher e pesado na balança (BK 300, GEHARA). Após a pesagem, foi feita a mistura manual até a homogeneização de todos os reagentes, obtendo-se um pó uniforme. Em seguida, a mistura foi fundida em cadinho de platina em forno JUNG (LF0914), com taxa de aquecimento de 10 °C/min até atingir 1000 °C, e posteriormente 3 °C/min até a temperatura de 1300 °C, na qual permaneceu por 120 minutos. Depois de fundida, a mistura foi imediatamente vertida em água, onde foi possível observar a formação de grânulos do material, mostrados na Figura 4.1.

Os grânulos obtidos do processo foram levados para moagem com água em moinho de bolas de alta energia (bolas de alumina Al₂O₃) (Reysch PM 100), durante 50 minutos. Após a moagem, o material foi seco em estufa (Odontobras 1.1) a 70°C

durante 48 horas, para a secagem. O pó proveniente do processo foi peneirado em peneira de 63 μm , com auxílio de um agitador mecânico, durante 3 minutos na intensidade máxima, a fim de refiná-lo. Na Figura 4.2, podem-se observar tanto os grânulos de vidro bioativo contendo nióbio quanto o pó proveniente do processo de moagem.



Figura 4.1: Grânulos de biovidro niobo-fosfato formados após a mistura fundida ser vertida em água.

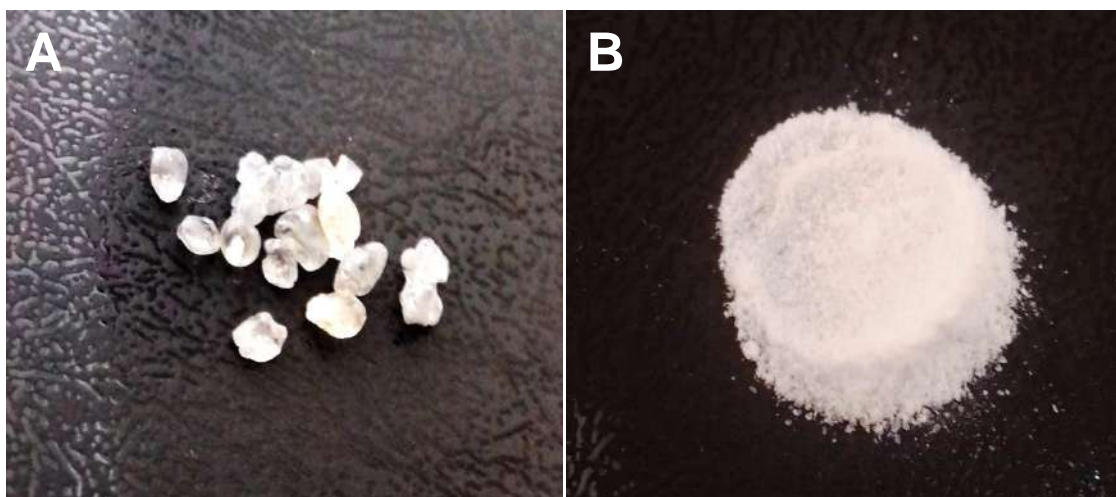


Figura 4.2: Imagem dos grânulos de biovidro niobo-fosfato (A) e do pó de biovidro proveniente do processo de moagem (B).

4.1.1. Alvos

Os alvos produzidos seguiram as exigências do equipamento no qual a deposição foi realizada. Desta forma, todos os alvos produzidos tiveram as dimensões de aproximadamente 1 polegada de diâmetro e aproximadamente 4 mm de altura, como pode ser observado na Figura 4.3.



Figura 4.3: Alvo de biovidro niobo-fosfato com diâmetro indicado.

Os alvos biovidro niobo-fosfato foram confeccionados a partir do pó obtido pelo processo de moagem. O pó foi levado até uma matriz com uma polegada de diâmetro e prensado a 30 MPa, durante aproximadamente 60 segundos. Após a prensagem, o corpo verde foi retirado da matriz e levado ao forno (Carbolite 1200) para sinterização a 750 °C por aproximadamente 180 minutos, com taxa de aquecimento de 5°C/min, dando origem assim ao alvo com dimensões, densidade e resistência mecânica exigida para a continuidade do trabalho.

O tratamento térmico ao qual o material foi submetido é importante para que haja sinterização da pastilha, como ilustrado no esquema apresentado na Figura 4.4, ou seja, para que haja diminuição da porosidade e união dos grânulos e, com isso, evitar que a pastilha se desfaça durante a manipulação e a deposição dos filmes finos.

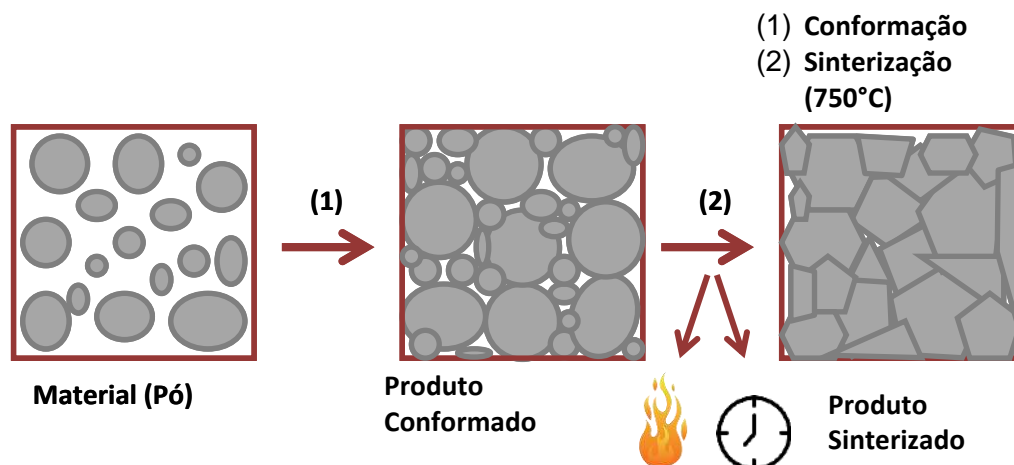


Figura 4.4: Esquema de produção e sinterização do alvo.

4.1.2. Preparo dos substratos

Como substratos para os recobrimentos de vidros bioativos, foram utilizados o titânio comercialmente puro e silício monocristalino. Foram cortados 60 substratos de titânio, nas dimensões recomendadas para a realização dos testes de cultura celular: 8 mm x 8 mm x 1 mm. Após o corte, os substratos foram lixados com lixas de granulação variando entre 400 e 600 grãos/pol² e lavados abundantemente com água destilada.

Os substratos de titânio foram submetidos a ataques ácidos, com ácido fluorídrico e ácido nítrico [HF/HNO₃], na concentração 70 ml de H₂O, 28 ml de HNO₃ e 2 ml de HF, durante 30 segundos. Em seguida, foi realizado o protocolo para limpeza da superfície, colocando-se as amostras em recipientes com água destilada e detergente sob agitação, usando ultrassom (UltraCleaner 1400, Unique), durante 10 minutos. Logo após, os substratos foram imersos em acetona e novamente agitados em ultrassom por 10 minutos para a remoção de gorduras finas. Ao final, os substratos foram enxaguados com água destilada em ultrassom durante 10 minutos e secos em estufa a 80 °C por 30 minutos, segundo a metodologia usado por ORTIZ *et al.* (2016).

Os substratos de silício (100) foram utilizados apenas para a medição da espessura dos filmes por perfilometria, uma vez que apresentam superfície com rugosidade inferior a do titânio tratado quimicamente. As amostras foram cortadas nas dimensões 10 mm x 10 mm e, para a realização da limpeza da superfície, foram imersas em acetona, levadas ao ultrassom por 10 minutos e, em seguida, secas com ar comprimido.

4.1.3. Técnica de deposição dos filmes de biovidro

O equipamento utilizado foi um reator de PLD montado no Laboratório de Plasma Aplicado do CBPF. O equipamento é composto por câmara de vácuo, bomba turbo molecular (EDWARDS 48000 rpm – STB 031/451), bomba mecânica (EDWARDS), unidade de controle de temperatura (NEOCERA), unidade de controle de rotação do alvo e software (NEOCERA).

O equipamento faz uso de um laser Nd:YAG (Brilliant B – Quantel) com comprimento de onda de 1064 nm. O alvo foi analisado por UV-Vis para verificar sua absorção óptica, onde foi constatada uma alta absorção para comprimentos de onda inferiores a 400 nm, como pode ser visto na Figura 4.5. Foi utilizado, portanto, o terceiro harmônico do laser, triplicando sua frequência e gerando um comprimento de onda de 355 nm.

Os parâmetros fixos usados no processo de deposição foram:

- pressão de base do sistema de 3×10^{-6} mbar;
- frequência de pulso de 10 Hz;
- distância entre o alvo e o porta-substrato de 3 cm;
- tempo de pulso 6 ns;
- tempo de deposição de 5 minutos.

O parâmetro de deposição variado foi a energia do pulso, e foram depositados filmes com energias de 50 e 100 mJ. Antes da deposição dos filmes, foi realizada a purga da câmara com argônio, para a limpeza.

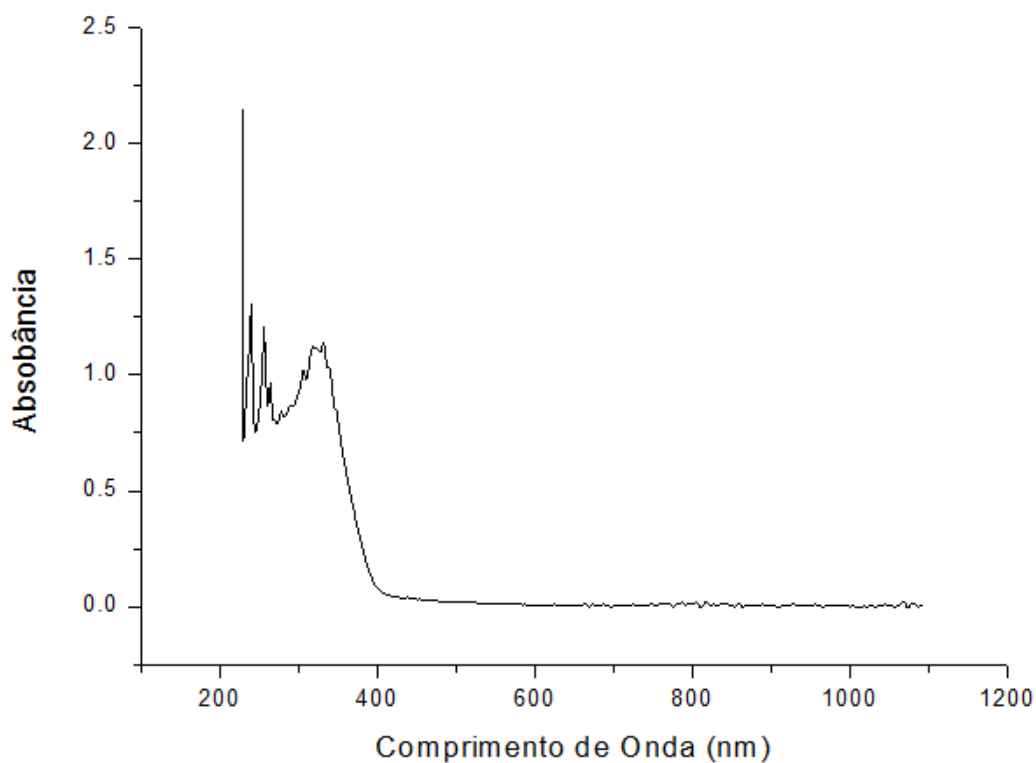


Figura 4.5: Espectro de absorbância do alvo por UV-Vis.

4.2. Técnicas de caracterização

4.2.1. Fluorescência de raios X

Para análise da composição química do material, tanto qualitativa quanto quantitativa, foi utilizada a técnica de fluorescência de raios X. A análise foi realizada no equipamento RIX3100 (Rigaku) com tubo de ródio do Núcleo de Catalise da COPPE/UFRJ.

4.2.2. Microscopia eletrônica de varredura

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada para caracterizar a morfologia de superfície do material. O equipamento de MEV utilizado na caracterização do pó e dos filmes foi *Field Emission Gun*, MEV-FEG, Mara FEI, modelo QUANTA FEG 250, usando uma voltagem inferior a 30 kV e para a caracterização dos alvos de biovidro foi utilizado o JSM6460LV (Jeol), com voltagem de 20 kV.

Para a detecção e quantificação dos elementos químicos presentes nas amostras acopla-se ao microscópio um espectrômetro de dispersão de elétrons (EDS).

4.2.3. Espectroscopia fotoeletrônica de raios-X (XPS)

A espectroscopia fotoeletrônica de raios-X, ou XPS, é a técnica que permite a identificação dos elementos que compõem o material e das ligações atômicas entre eles. O equipamento de XPS utilizado para a caracterização do alvo e das amostras depositadas foi SPECS PHOIBOS 100/150 (Laboratório de Superfícies - CBPF), com fonte de Al K α (1486,6 eV de energia), energia de passo de 30,0 eV e passo de 0,5 eV para espectro *espectro de baixa resolução*, e 0,02 eV de passo para espectros de alta resolução. Foi realizada limpeza da superfície da pastilha por sputtering de íons de argônio durante 10 minutos. Para a análise e a identificação do cada pico de elemento medido pelo XPS, foi utilizado o software CASA-XPS da SPECS. Os espectros de alta resolução foram calibrados a partir do carbono (C 1s = 284,6 eV).

Para a identificação das ligações atômicas entre os elementos, foi realizada a deconvolução dos espectros de alta resolução. Cada novo pico encontrado após o ajuste e a deconvolução foi identificado pela literatura.

A identificação da composição da superfície das amostras pode ser calculada por uma relação entre o fator de sensibilidade (RSF) e a área, os valores para o cálculo da relação pode ser encontrado no programa CASA-XPS. Na Tabela 4.1, estão descritos os valores de RSF dos elementos usados para relação.

Tabela 4.1: Dados do RSF dos elementos

Elemento	RSF
Cálcio (2p _{3/2})	3,35
Nióbio (3d)	8,21
Fósforo (2p)	1,19

Conhecendo os valores de RSF, foram calculados para o alvo e para os dois filmes, a razão entre os elementos como indicado nas equações 4.1 e 4.2:

$$Ca/Nb = \frac{A_{Ca}/RSF_{Ca}}{A_{Nb}/RSF_{Nb}} \quad \text{Eq. 4.1}$$

$$Ca/P = \frac{A_{Ca}/RSF_{Ca}}{A_P/RSF_P} \quad \text{Eq. 4.2}$$

4.2.4. Difração de Raios X

A identificação de possíveis fases cristalinas do pó, do alvo e dos filmes foi realizada por difração de raios X. O uso desta técnica possibilitou a comparação entre o material inicial (pó), o alvo e os filmes, com o objetivo de verificar se foi formada uma vitrocerâmica durante a síntese do alvo ou se houve outra transformação de fase durante a deposição dos filmes. Os parâmetros usados para a caracterização do pó e do alvo são: configuração Bragg-Brentano, varredura de 2θ de 10 a 80°, passo de 0,02° e 0,6 segundos por passo. Para a dos filmes, foi realizado difração com incidência de ângulo rasante 5°, varredura 2θ de 10 a 80°, passo de 0,02° e 1 segundo por passo. O equipamento utilizado foi o D8 DISCOVER, da BRUKER, com fonte de raios X com alvo de cobre e detector LINXEYE XE.

4.2.5. Teste de risco

Para medir a aderência do recobrimento de vidro bioativo ao substrato de titânio, foram realizados testes de risco (*scratch tests*) nas amostras depositadas. Foi selecionada uma amostra de cada filme e em cada uma dela foram feito cinco riscos , como indicado na norma ASTM C1624-05.

No teste de risco, um penetrador é deslizado sobre uma amostra, medindo a profundidade de penetração, a força normal e a força lateral. Com base nessas medidas, o coeficiente de atrito é calculado e a carga necessária para causar uma falha de adesão (carga crítica) é determinada. Além disso, a técnica permite avaliar como, de fato, a falha de adesão ocorre, combinando essas informações com o sinal de ultrassom emitido no momento da falha e as imagens de microscopia da amostra após o ensaio. Os testes de adesão do recobrimento foram realizados no equipamento Universal Mechanical Tester (Bruker).

4.2.6. Perfilometria

A técnica de perfilometria é empregada na caracterização da topografia da superfície do material e espessura dos filmes. A partir dela pode ser avaliada a rugosidade média aritmética (R_a) do recobrimento, como mostrado na equação 4.3, onde n é o número de pontos obtidos no perfil e y_i é a altura do ponto i . O equipamento varre a superfície investigada, registrando os movimentos com uma sonda. Cada alteração de altura gera sinais que são interpretados digitalmente, como pode ser observado no esquema representado na Figura 4.6. As informações recebidas são analisadas, traçando assim o perfil de rugosidade da superfície do material. Para essa análise por perfilometria, amostras foram depositadas em silício (100) com um degrau entre o substrato e a superfície do filme, de modo que o perfilômetro medisse a espessura nesse degrau. O perfilômetro utilizado é um TAYLOR HOBSON do Laboratório de Metrologia da COPPE/UFRJ.

$$R_a = \frac{1}{n} \sum_{y=1}^n |y_i - \bar{y}| \quad \text{Eq. 4.3}$$

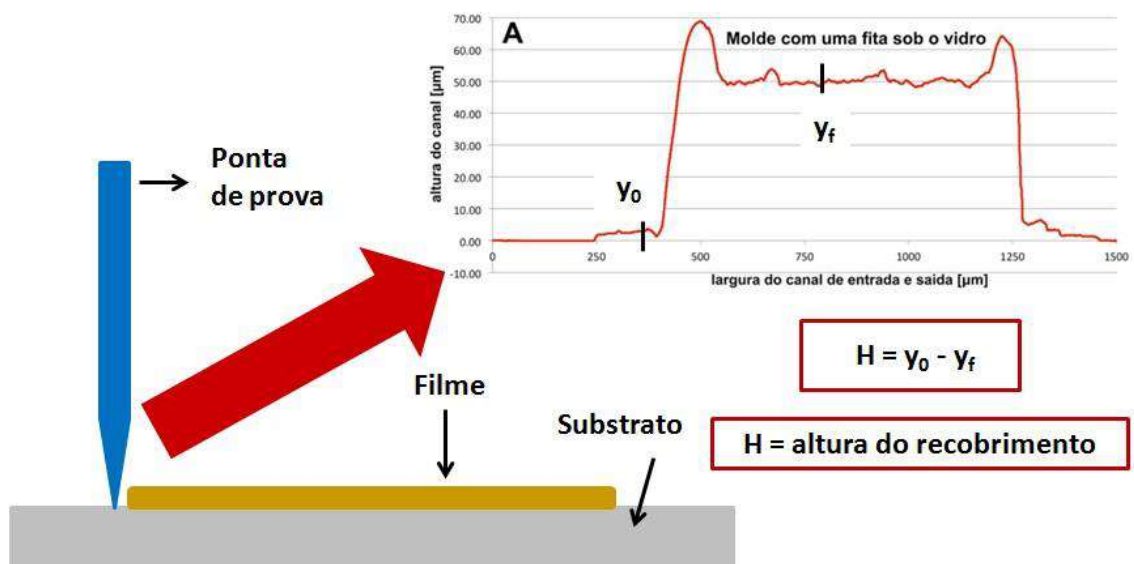


Figura 4.6: Esquema do perfilômetro.

4.2.7. Microscopia de força atômica (AFM)

Para medir a espessura do filme com uma resolução maior do que a obtida por perfilometria foi utilizada a técnica de microscopia de força atômica. A análise foi realizada em um microscópio Alpha300 AR (WITEC Instruments, Alemanha) em modo de contato intermitente. As imagens foram obtidas com 50 x 60 μm , com duas análises por amostra, e um perfil de altura médio foi obtido ao longo dos degraus para que o valor de espessura fosse calculado.

4.2.8. Determinação de ângulo de contato

A determinação do ângulo de contato é uma das técnicas utilizadas para medir molhabilidade, que se baseia na habilidade de uma superfície em manter-se em contato com líquidos. Essa propriedade é fundamental para materiais de implante, uma vez que existe uma relação direta entre a hidrofiliabilidade e o espalhamento celular (ELIAS e MEIRELLES, 2010; ELIAS *et al.*, 2008). O ângulo para a análise de molhabilidade é formado entre a gota do líquido e a superfície do material no qual ela repousa. Pode-se dizer que a propriedade de superfície depende do equilíbrio e da relação de três interfaces diferentes: entre líquido e atmosfera, líquido e sólido e sólido e atmosfera.

A técnica faz o uso de um goniômetro, permitindo a classificação das superfícies em hidrofílicas e hidrofóbicas. Sendo assim, quando o ângulo de contato (θ) assume valores situados entre 0° e 90°, o líquido molha a superfície e essa é então hidrofílica. Caso os valores encontrados estejam acima de 90°, o líquido não molha a superfície, classificando-a como hidrofóbica. A Figura 4.7 mostra, esquematicamente, o ângulo de contato θ_c relacionado às energias de superfície das diferentes interfaces (γ_{LG} , γ_{SG} e γ_{SL}). A análise do ângulo de contato foi realizada em um goniômetro 500-F1 (ramé-hart instrument co.), do Laboratório de Superfícies e Filmes Finos da COPPE/UFRJ, para qual foi selecionada uma amostra de cada tipo, sendo medidos ângulos em três gotas distintas (por amostra). Cada gota gerou 50 medições, com um intervalo de um segundo entre medições. O valor do ângulo de contato apresentado neste trabalho é a média das 150 medidas, combinando as três gotas por cada amostra.

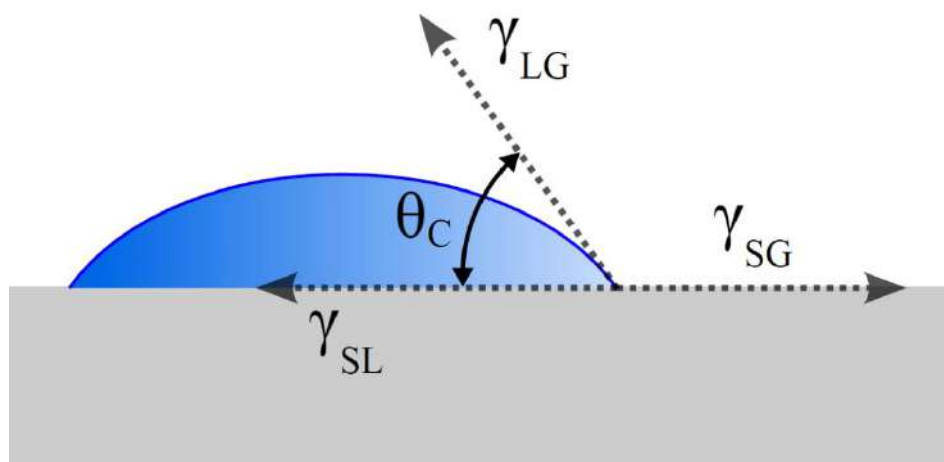


Figura 4.7: Esquema do ângulo de contato de uma gota repousando sobre uma superfície. (Domínio público)

4.3. Ensaios *in vitro*

Os ensaios *in vitro* foram realizados no Laboratório de Cultura de Células do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

4.3.1. Cultura de células

A linhagem celular de pré-osteoblastos murinos MC3T3-E1 (ATCC® CRL-2594™) foram cultivadas em garrafa com meio alfa-MEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB) e mantidos numa atmosfera umidificada com 95% de ar e 5% de CO_2 a 37 °C. As células sub-confluentes foram semeadas a uma densidade de $0,2 \times 10^4$ utilizando tripsina a 0,01% e EDTA 1 mM em superfícies de titânio recobertas com biovidro e mantidas em condições controladas de cultura durante 48 horas.

4.3.2. Proliferação celular

As superfícies de titânio recobertas foram semeadas com células e fixadas após 48 horas de cultura em paraformaldeído a 4% em PBS, permeabilizada durante 10 min em Triton X-100 a 0,1% em PBS e bloqueada com BSA a 3% e Triton a 0,01% X-100 em PBS durante 1 hora à temperatura ambiente. A proliferação celular foi avaliada mediante uma quantificação do número de células, avaliando se os núcleos foram

corados com DAPI (marcador nuclear). O número total de células foi quantificado digitalmente a partir das imagens capturadas utilizando o *software* Image-Pro Plus 6.0 (total de oito campos/amostra em duplicata). Todas as amostras foram comparadas ao controle (superfície de titânio).

4.3.3. Contato focal

As superfícies semeadas com células foram fixadas após 48h de cultura em paraformaldeído a 4% em PBS, permeabilizadas durante 10 min em Triton X-100 a 0,1% em PBS e bloqueada com BSA a 3% e Triton a 0,01% X-100 em PBS durante 1 hora à temperatura ambiente (TA). As amostras foram então incubadas com anticorpos anti-vinculina (1:150; Sigma), lavadas três vezes com PBS seguido de anticorpo secundário Alexa 488. Após sucessivas lavagens, o citoesqueleto celular foi marcado para actina com anticorpo Alexa Fluor 546-phalloidin (1: 80; Invitrogen) (30 min à temperatura ambiente), lavadas três vezes em PBS e montadas em lâminulas de vidro em DAPI Fluorshield (marcador de núcleo; Sigma). As imagens foram adquiridas utilizando um microscópio óptico Zeiss Axio Observer A1 utilizando acessório em sistema de planos ópticos Z-stack.

5. Resultados e discussão

Este capítulo foi dividido em quatro partes, correspondentes aos seguintes resultados: (1) caracterização do vidro bioativo contendo nióbio; (2) caracterização do alvo de biovidro contendo nióbio; (3) caracterização dos filmes de biovidro contendo nióbio e (4) ensaios *in vitro* dos filmes de biovidro contendo nióbio.

5.1. Caracterização do Vidro Bioativo contendo Nióbio

Para a avaliação da morfologia e do tamanho de grão do pó, foi utilizada a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A Figura 5.1 mostra as eletromicrografias (MEV) do vidro bioativo contendo nióbio após a moagem e peneiramento do material, a partir da qual se pode observar dispersão de partículas de diferentes tamanhos, apresentando faces lisas provenientes da fratura do material durante a moagem.

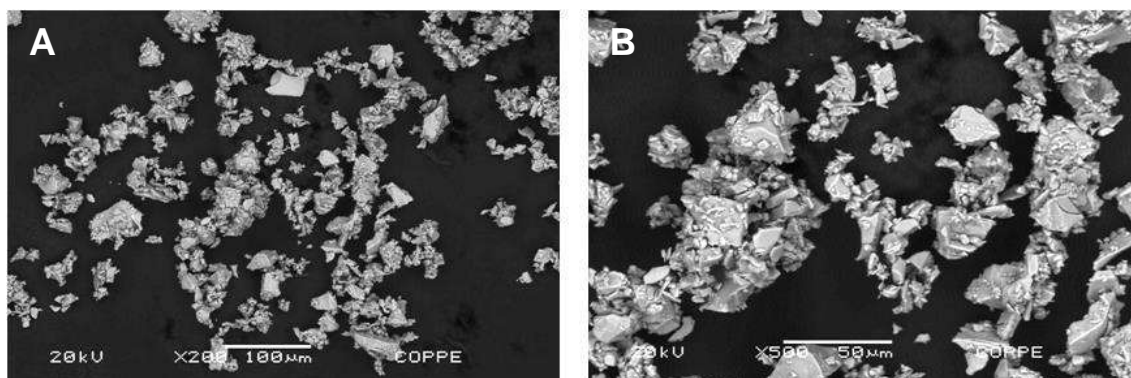


Figura 5.1: (A) Eletromicrografia (MEV) com aumento de 200x e (B) Eletromicrografia (MEV) com aumento de 500x.

Para a avaliação da composição química do material em forma de pó, foi utilizada espectroscopia por energia dispersiva (EDS). Os resultados podem ser observados nas Tabelas 5.1 e 5.2 e na Figura 5.2. A Tabela 5.1 apresenta a composição do material; a análise revela a presença de carbono, proveniente da contaminação e da fita de carbono utilizada para prender o pó de biovidro para análise, e de alumínio, vindo da contaminação do moinho de bolas de alumina. A Tabela 5.2, corresponde

aos resultados temos os valores de cada elemento sem a contribuição do alumínio e do carbono.

Tabela 5.1: Composição química do pó de biovidro.

	C	O	Al	P	Ca	Nb
% em peso	23,74	26,75	0,73	10,86	10,16	27,75
% atômica	43,17	36,52	0,59	7,66	5,54	6,52

Tabela 5.2: Composição química do pó de biovidro sem a contribuição de carbono e alumínio.

	O	P	Ca	Nb
% em peso	35,42	14,38	13,45	36,75
% atômica	64,94	13,62	9,85	11,59

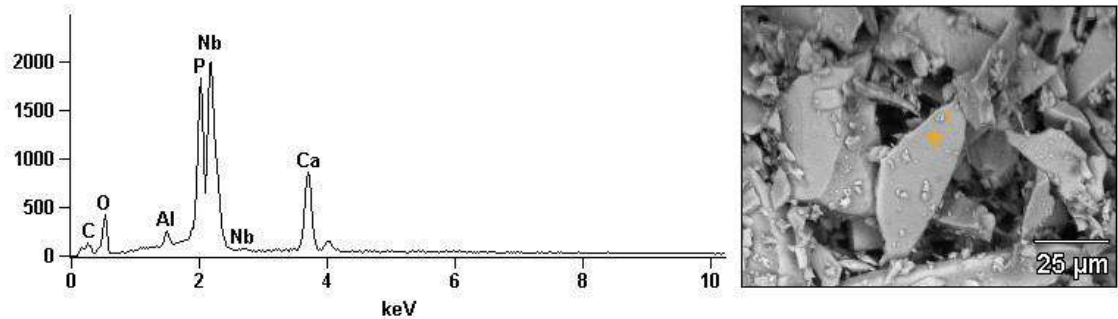


Figura 5.2: Espectro de EDS com os picos referentes a cada elemento e a imagem da região na qual as informações foram coletadas.

Para complementar e aprimorar os resultados sobre a composição química do material foi realizada a análise por fluorescência de raios-X (FRX), a partir da qual foram obtidas as concentrações dos elementos Nb, Ca, P e F, listados na Tabela 5.3. Pode-se observar na Tabela que a composição do pó desviou da composição nominal, principalmente devido à ausência do flúor.

Tabela 5.3: Resultados da fluorescência de raios-X com as concentrações referentes ao pó.

	% peso (nominal)	% peso (medido)	% molar (nominal)	% molar (medido)
Nb	56,92	56,53	30,00	37,61
Ca	16,33	20,23	20,00	15,77
P	18,99	23,19	30,00	46,27
F	7,76	0,05	20,00	0,35

Tanto na análise por EDS quanto por FRX, não foi detectada a presença de flúor, o que pode ser explicado pelas características químicas dos reagentes utilizados. Na Figura 5.3 pode ser observado o diagrama de fases CaO/CaF₂, onde se pode perceber que, acima de 1360 °C, CaF₂ não é uma fase termodinamicamente estável. Como a sinterização é realizada em temperaturas próximas a essa, e o flúor é um elemento volátil, ele pode evaporar durante o tratamento térmico, sendo substituído por oxigênio de origem atmosférica. Contudo, como o CaF₂ é um composto utilizado somente para a diminuição da viscosidade do biovidro fundido, sua ausência na composição final não deve causar alterações significativas na resposta celular do material.

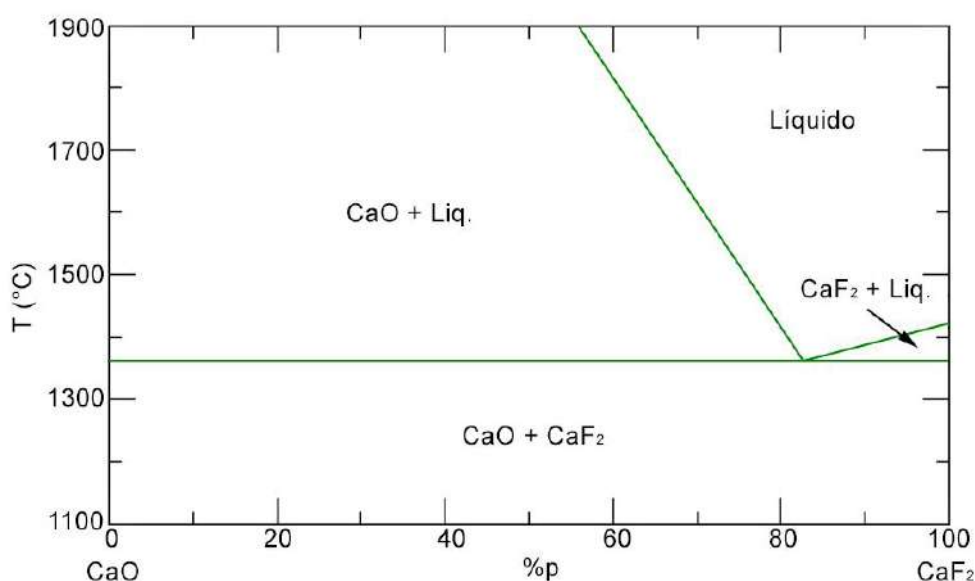


Figura 5.3: Diagrama de fases CaO/CaF₂ (adaptado de CHATTERJEE e ZHMOIDIN, 1972)

Para a confirmação de que o material produzido é vítreo, foi realizado um ensaio de difração de raios-X (DRX). A partir do difratograma representado na Figura 5.4, é possível concluir que a estrutura do material produzido é amorfa, pois não é possível a observação de picos referentes a fases cristalinas, havendo somente a presença de um halo característico de fase amorfa. De fato, o processamento do material envolve a fusão em forno e o resfriamento rápido em água fria, o que não permite a reacomodação dos átomos em uma estrutura ordenada e o torna amorfo.

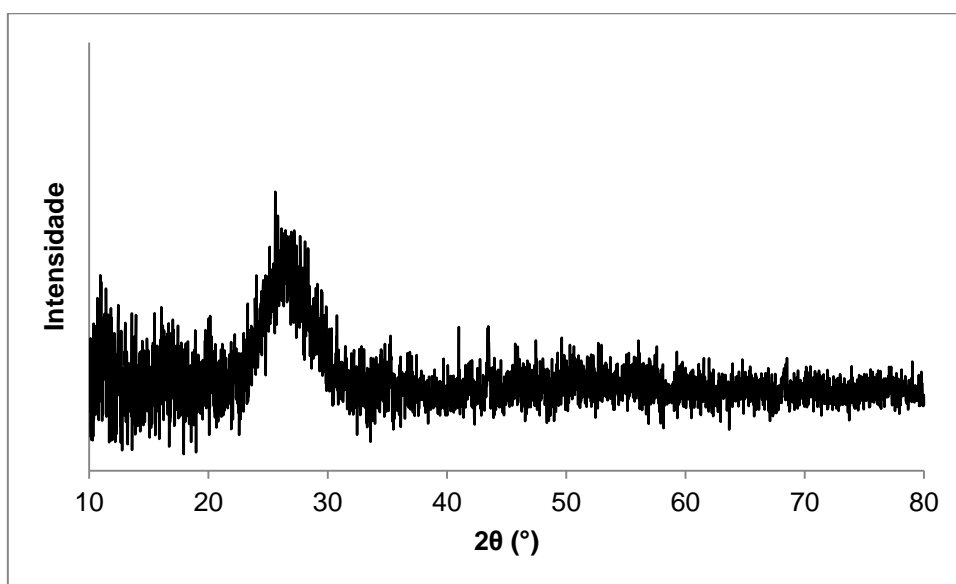


Figura 5.4: Difratograma do pó de Biovidro Niobo-fosfato

5.2. Caracterização do Alvo de Biovidro contendo Nióbio

Para a caracterização da morfologia superficial do alvo e verificação da densificação da pastilha após sinterização e tratamento térmico, foi realizada a análise de MEV. A Figura 5.4 traz uma imagem do alvo de biovidro niobo-fosfato. Pela imagem, podemos perceber que, após o tratamento térmico descrito na seção 4.1.1, houve densificação do material, com a formação de agregados e grande dispersão de tamanho de partículas.

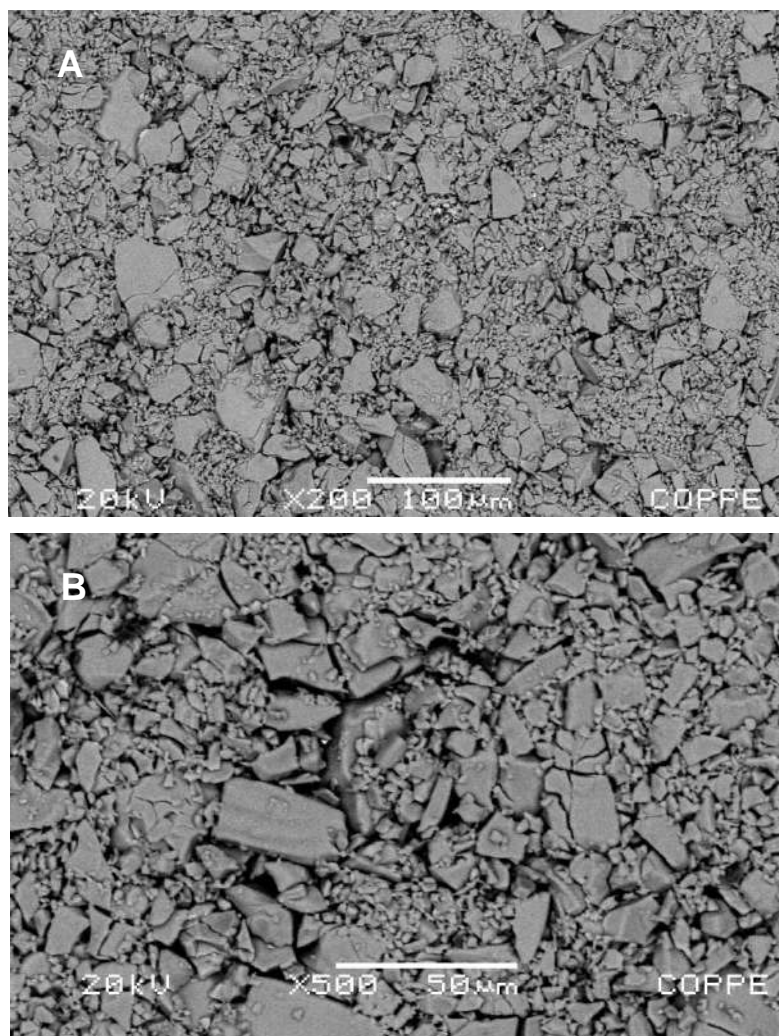


Figura 5.4: Imagens de microscopia eletrônica de varredura para verificação da densificação da pastilha após tratamento térmico. Aumentos de (a) 200x; (b) 500x.

A pastilha sofreu tratamento térmico a 750 °C, um pouco acima da sua temperatura de transição vítrea, para adquirir densidade, rigidez e propriedades mecânicas necessárias à utilização da técnica de deposição por laser pulsado. Foi realizada a análise por difração de raios-X da pastilha para verificar se, durante o processo, houve transformação de fase. A Figura 5.5 representa o difratograma do alvo, onde pode ser observada a presença de picos cristalinos, evidenciando as transformações de fase ocorridas de um material amorfo para uma vitro-cerâmica. Observa-se, no difratograma, a presença de duas diferentes fases cristalinas, Nb_2O_5 e $\text{CaNb}_2\text{O}_6(\text{P}_2\text{O}_5)$.

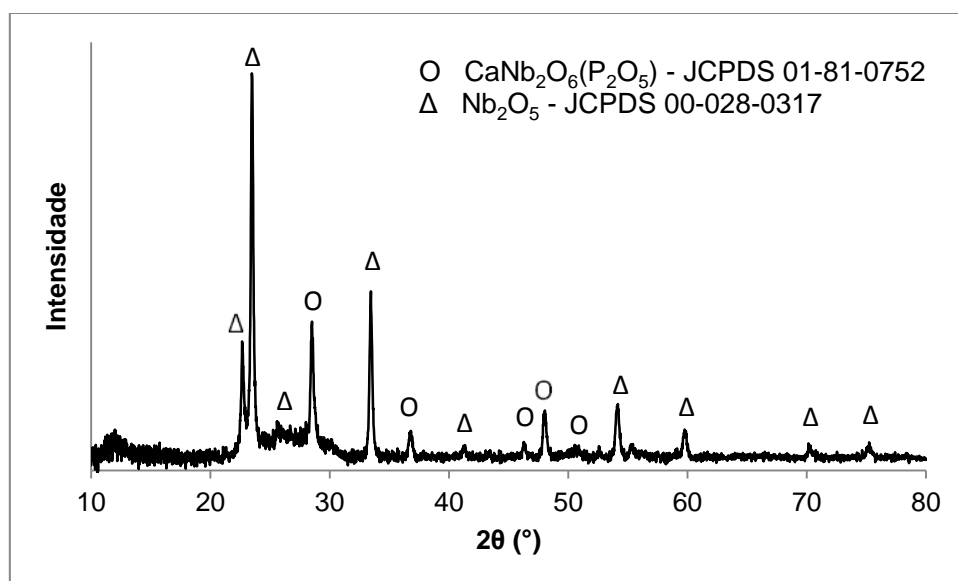


Figura 5.5: Difratoograma do alvo com a indicação dos picos e suas fases cristalinas.

Além da caracterização por difração de raios-X, que identificou as fase cristalinas presentes no material, foi realizada análise por XPS para identificação dos elementos que compõem o alvo. O espectro de baixa resolução pode ser observado na Figura 5.6 (a), que mostra os picos referentes aos elementos presentes na superfície da pastilha (carbono, cálcio, fósforo, nióbio e oxigênio). As Figuras 5.6 (b-f) são referentes às medidas de alta resolução feitas no XPS.

A deconvolução e os ajustes feitos no pico de C 1s (Figura 5.6 (b)), revelam a presença de duas curvas. A primeira (na posição 284,6 eV) representa a ligação de hidrocarbonetos (CH_x) adsorvidos na superfície, provenientes da contaminação do alvo pela atmosfera do ambiente em que estava exposto. O pico de deconvolução do carbono com a energia em 287,9 eV é referente ao carbono ligado a oxigênio, formando espécies carboxilas (COOH). (MOULDER *et al*, 1992)

Após o ajuste da curva de O 1s (Figura 5.6 (c)), tem-se a indicação de três energias de ligação, com picos em 529,2 eV e 530,2 eV. São energias características de oxigênio ligado a metal O-Ca e O-Nb, respectivamente (MOULDER *et al*, 1992) e 531,5 eV é a energia atribuída ao oxigênio ligado ao fósforo na estrutura de um pirofosfato (P_2O_5). (GRESCH, *et al*. 1979)

Na Figura 5.6 (d) apresenta as curvas de deconvolução do pico do Nb 3d, indicando outros dois picos de energias de ligação 205,5 eV e 207,0 eV. A primeira corresponde à energia de ligação do nióbio com o oxigênio (Nb-O) na estrutura NbO_2

(Nb⁺⁴). A segunda energia, 207,0 eV, representa a ligação do nióbio com oxigênios (Nb-O) na composição (Nb₂O₅) e a ligação do nióbio no composto CaNb₂O₆ ou seja, de estado de oxidação Nb⁺⁵ (BAHL, 1974; MOULDER *et al.*, 1992).

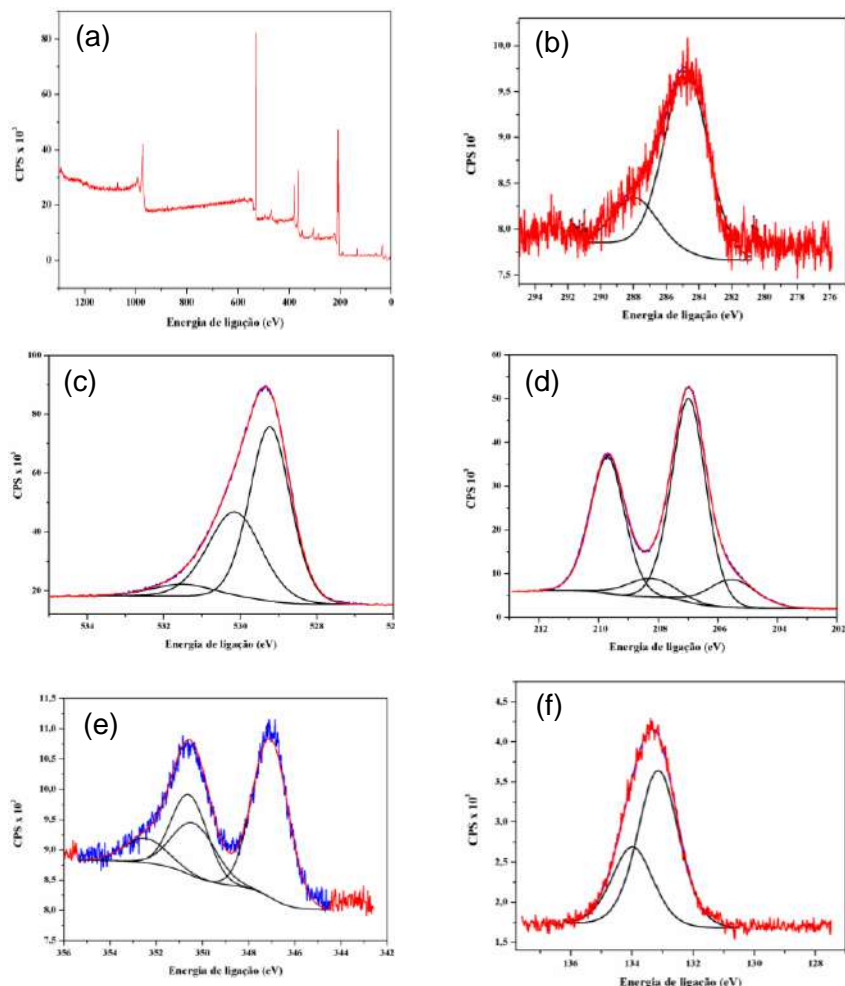


Figura 5.6: Espectros de XPS do alvo (a) *espectro de baixa resolução*; (b) espectro de alta resolução carbono; (c) espectro de alta resolução oxigênio; (d) espectro de alta resolução do nióbio; (e) espectro de alta resolução do cálcio; (f) espectro de alta resolução do fósforo.

O ajuste do cálcio 2p (Figura 5.6 (e)) indica o pico de energia em 347,1 eV, sugerindo a ligação do cálcio em uma estrutura com um metal e oxigênio Ca-O-Nb (CaNbO₄) e o cálcio ligado a um radical carboxil, provavelmente vindo de contaminação de ar atmosférico na superfície da pastilha. As duas espécies têm energias de ligação com o cálcio semelhantes. (MOULDER *et al.*, 1992; DEMRI e MUSTER, 1995)

Por fim, com o ajuste do fósforo 2p, indicado na Figura 5.6 (f), foi identificado um valor de energia em 133,1 eV, pertencente à energia de ligação do fósforo com oxigênios, formando íons PO_4^{3-} na estrutura do P_2O_5 . (MOULDER *et al*, 1992)

Todos os valores medidos nos espectros de alta resolução para energia de ligação dos elementos constituintes do material estão apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4: Energias de ligação medidas nos espectros de alta resolução de XPS do alvo.

Elemento	Energia de ligação (eV)	Ligação
C (1s)	284,6	CH_x
	287,9	COOH
O (1s)	529,2	O-Ca
	530,2	O-Nb
	531,5	O-P
Nb (3d)	205,5	Nb-O
	207,0	Nb-O e/ou Ca-Nb-O
Ca (2p)	347,1	Ca-Nb-O e/ou Ca-COOH
P (2p)	133,1	P-O

A partir da análise por XPS, é possível confirmar a composição química do material e calcular a quantidade de cada componente presente na amostra. Fazendo o uso dos valores de RSF (Tabela 4.1), de área (Tabela 5.5) e das equações 4.1 e 4.2, foi calculada a composição química da amostra e, subsequentemente, foi determinada a estrutura química como sendo $(\text{CaNb}_2\text{O}_6(\text{P}_2\text{O}_5)) + 6 (\text{NbO}_x) + 0,28 (\text{CaCOOH})$.

O NbO_x representa duas possíveis combinações dos óxidos de nióbio formados na superfície das amostras, Nb_2O_5 e NbO_2 .

A estrutura estequiométrica encontrada pelo estudo e identificação das ligações atômicas dos elementos foi a mesma observada na análise de DRX, observada no difratograma da Figura 5.5. Na primeira estão presentes duas fases cristalinas, Nb_2O_5

e $\text{CaNb}_2\text{O}_6(\text{P}_2\text{O}_5)$, as quais foram confirmadas na análise por XPS. Este fato sugere, ainda, que na superfície há maior quantidade de óxido de nióbio, seguida de CaNb_2O_6 (P_2O_5) e, por fim, uma pequena quantidade de cálcio ligado à carboxila, que está associado à contaminação de superfície que o material sofre quando em contato com a atmosfera.

Tabela 5.5: Os valores de áreas aproximado medidos nos espectros de XPS e concentrações relativas calculadas para os três elementos.

Elemento	Área	Concentração relativa
Cálcio (2p _{3/2})	4998	11,4%
Nióbio (3d)	76104	70,8%
Fósforo (2p)	2763	17,7%

5.3. Caracterização dos Filmes

Os filmes foram caracterizados e comparados quanto a sua morfologia de superfície, fazendo análises de molhabilidade com o ângulo de contato, adesão com os testes de risco, espessura do filme por perfilometria, respostas de bioatividade e ensaios celulares. Além desses testes, foram feitos difração de raios-X para verificar se as fases cristalinas ainda estão presentes, e XPS, para a identificação dos elementos que compõem o material e avaliar se houve a transferência da estequiometria do alvo para o filme, como sugere a técnica eleita para a deposição.

Após a deposição nas condições descritas no capítulo 3, as amostras depositadas com 50 e 100 mJ tiveram suas morfologias superficiais avaliadas por microscopia eletrônica de varredura. As Figuras 5.7 e 5.8 são imagens dos filmes depositados, onde é observada a presença de *droplets* na superfície. Os *droplets* são estruturas inerentes à técnica de deposição, consistindo em um agregado de partículas do material arrancado pelo feixe incidente de alta energia (EASON, 2007). Como principal diferença entre os filmes de 50 e 100 mJ, os filmes depositados com maior energia apresentam *droplets* maiores, o que pode ser associado a uma maior energia de laser incidente e, conseqüentemente, maiores estruturas arrancadas do alvo. Nos filmes depositados com 50 mJ, observou-se um aspecto mais rugoso e *droplets* menores e mais dispersos pela superfície.

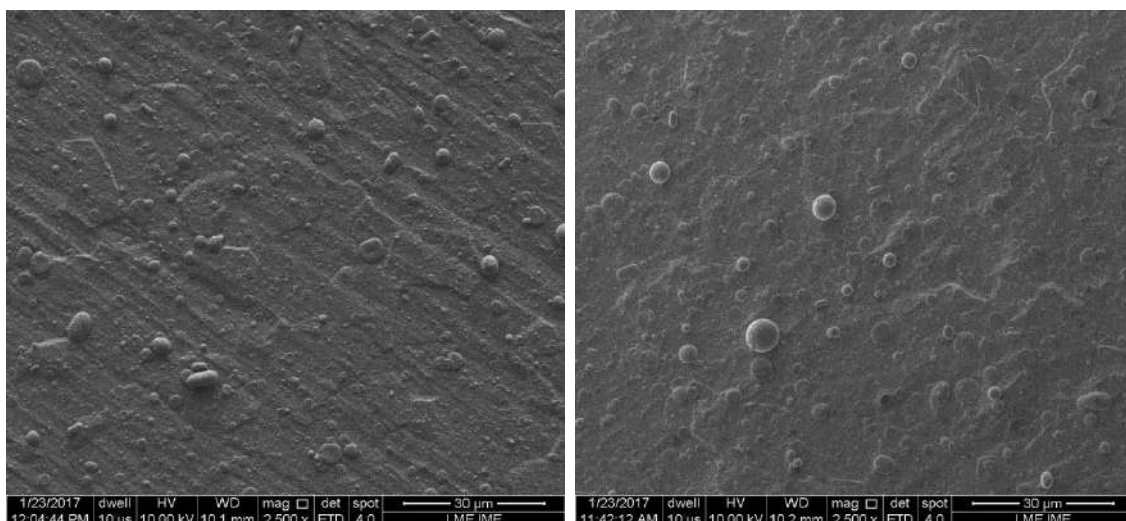


Figura 5.7: Eletromicrografia (MEV) com aumento de 2500x de um filme depositado com 50 mJ (esquerda) e um filme depositado com 100 mJ (direita).

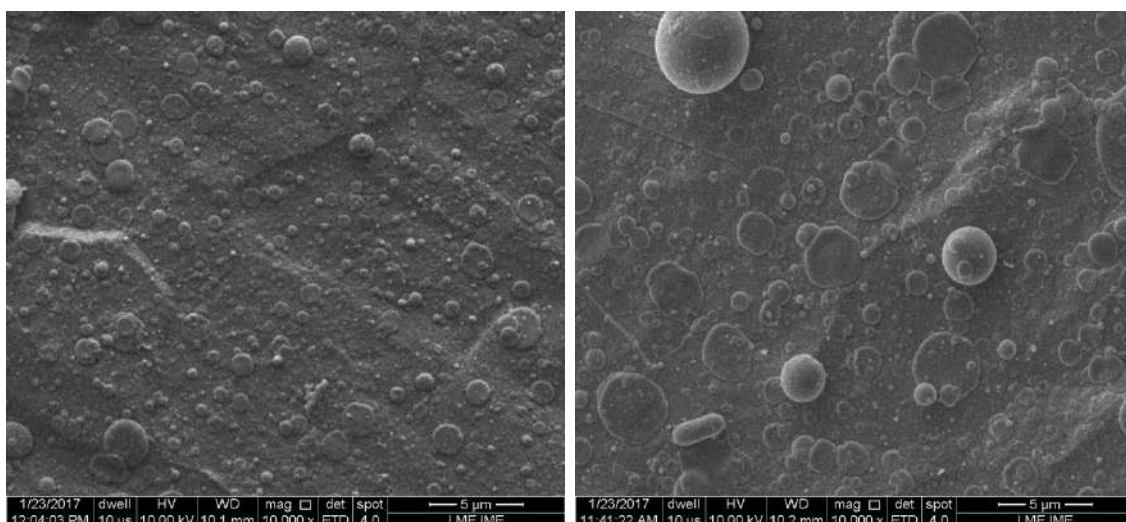


Figura 5.8: Eletromicrografia (MEV) com aumento de 10.000x dos filmes de biovidro niobofosfato depositados com 50 mJ (esquerda) e 100 mJ (direita).

TANASKOVISC *et al.* (2007) sugerem que a alta densidade das partículas depositadas por PLD leva a um aumento do crescimento e proliferação celular na superfície da amostra, por aumentar a superfície de contato das células com o biovidro, e provir mais pontos de ancoragem mecânica.

Para identificação dos elementos que compõem os filmes, foi realizada uma análise por EDS. A Tabela 5.6 e o espectro representado na Figura 5.9 mostram os

elementos presentes no filme depositado com 50 mJ de energia, confirmando a presença de nióbio, cálcio, carbono, oxigênio, fósforo e titânio. A Tabela 5.7 apresenta os valores percentuais sem a contribuição do titânio, uma vez que o titânio presente tem sua origem no substrato. A Tabela 5.8 mostra a relação e a quantidade de cada elemento presente na amostra e a Tabela 5.9 valores dos elementos sem a contribuição do titânio. A Figura 5.10 traz um espectro de EDS com os elementos presentes nos filmes depositados com 100 mJ.

Tabela 5.6: Elementos presentes no filme depositado com 50 mJ.

	Carbono	Oxigênio	Fósforo	Cálcio	Titânio	Nióbio
% peso	0,80	17,44	0,92	1,23	74,08	5,53
% atômica	2,37	38,60	1,05	1,09	54,79	2,11

Tabela 5.7: Elementos presentes no filme depositado com 50 mJ, sem a contribuição do titânio.

	Carbono	Oxigênio	Fósforo	Cálcio	Nióbio
% peso	3,1	67,3	3,5	4,7	21,3
% atômica	5,2	85,4	2,3	2,4	4,7

Tabela 5.8: Elementos presentes no filme depositado com 100 mJ.

	Carbono	Oxigênio	Fósforo	Cálcio	Titânio	Nióbio
% peso	0,09	11,89	0,84	1,24	83,58	3,94
% atômica	0,28	10,42	0,73	1,24	69,58	1,70

Tabela 5.9: Elementos presentes no filme depositado com 100 mJ, sem a contribuição do titânio.

	Carbono	Oxigênio	Fósforo	Cálcio	Nióbio
% peso	0,5	66,1	4,7	6,9	21,9
% atômica	1,9	72,5	5,1	8,6	11,8

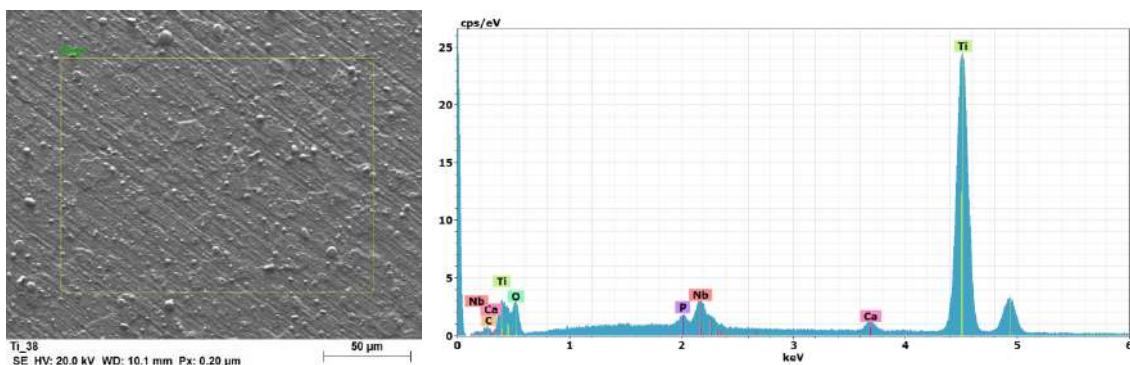


Figura 5.9: Análise de EDS do filme depositados com 50 mJ mostrando a área selecionada para o EDS e o espectro dos elementos que compõem o filme.

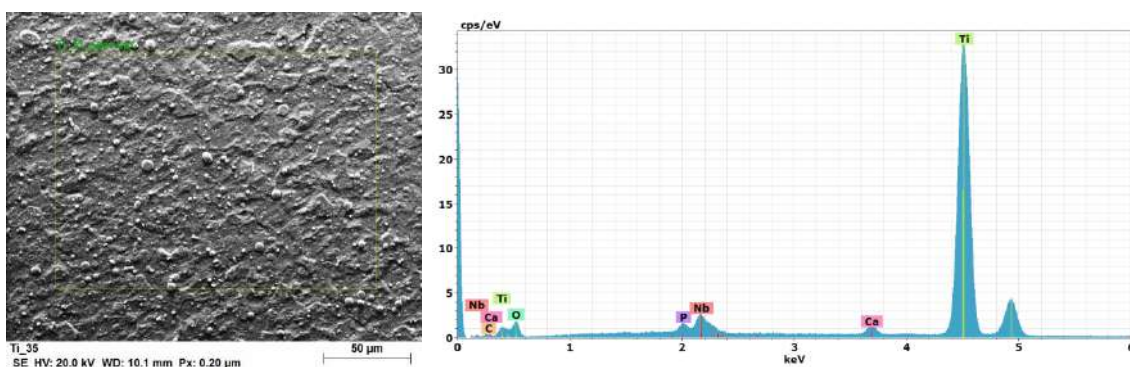


Figura 5.10: Análise de EDS do filme depositados com 100 mJ mostrando a área selecionada para o EDS e o espectro dos elementos que compõem o filme.

Para determinar a composição da superfície do filme, as ligações atômicas entre os elementos e a quantidade de cada composto na superfície, a caracterização eleita foi o XPS. Assim como se observou na caracterização do alvo, a Figura 5.11 (a) mostra o espectro total dos elementos que estão presentes na superfície do material. A única diferença entre os resultados do EDS e do XPS está na ausência do titânio no segundo, que se deve ao fato do XPS ser uma caracterização apenas de superfície, identificando até 5 nm de profundidade, enquanto o EDS colhe informações de até 4 μm de espessura, conseguindo assim identificar o titânio dos substratos. (GOLDSTEIN *et al.*, 2003)

As ligações atômicas entre os constituintes foram avaliadas segundo os espectros de XPS de alta resolução de todos os elementos (Figura 5.11 (b-f)). Nota-se no espectro de alta resolução do cálcio que o pico localizado em 284,6 eV corresponde ao carbono 1s ligado a contaminação (CHx) (Figura 5.11 (b)), o pico em 286,0 eV é

referente ao carbono ligado ao álcool/éster, que também é provavelmente oriundo da contaminação de superfície, e por fim, o pico em 288,3 eV, que é característico de carbono ligado a oxigênio na molécula de carboxila (COOH). (MOULDER *et al.*, 1992)

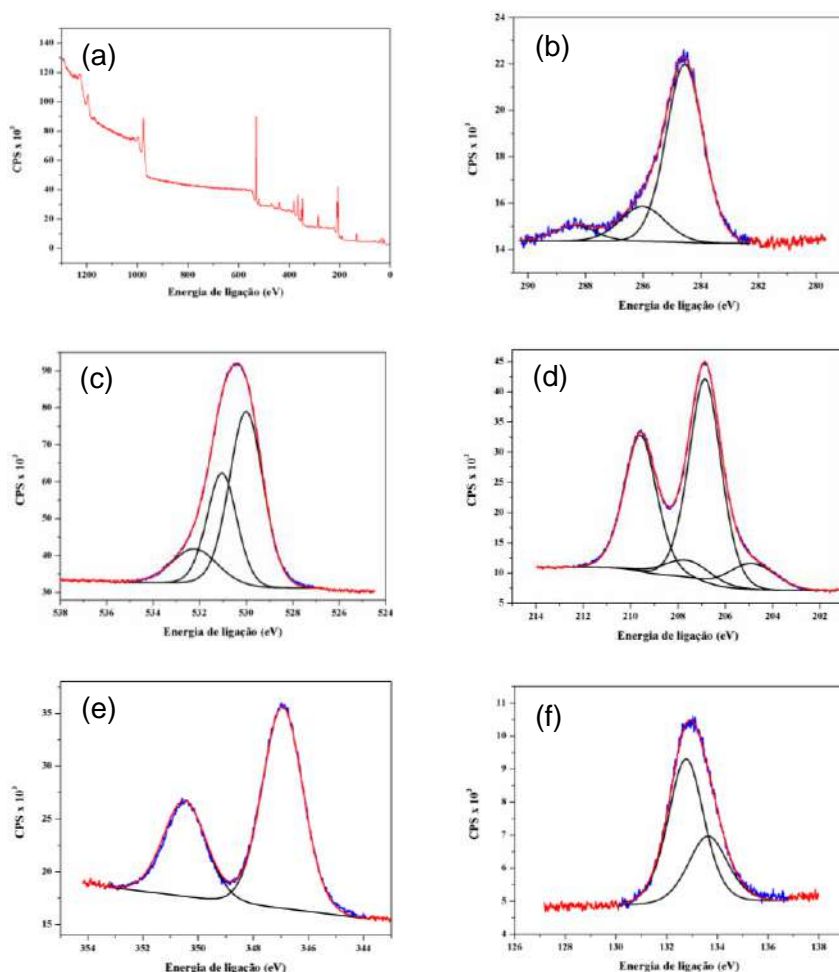


Figura 5.11: Espectros de XPS dos filmes depositados a 50 mJ: (a) *espectro de baixa resolução*; (b) *espectro de alta resolução carbono*; (c) *espectro de alta resolução oxigênio*; (d) *espectro de alta resolução do nióbio*; (e) *espectro de alta resolução do cálcio*; (f) *espectro de alta resolução do fósforo*.

O espectro apresentado na Figura 5.11 (c) mostra o ajuste do oxigênio 1s e sugere três diferentes picos de energia: 530,0 eV, que representa o oxigênio ligado a um metal, podendo ser cálcio ou nióbio, sugerindo mais fortemente a ligação com o cálcio pela intensidade do pico (Ca-O); 531,0 eV, indicando o oxigênio ligado ao nióbio (Nb-O) (referencia), e o pico de energia em 532,2 eV é atribuído à ligação entre oxigênio e o fósforo em uma estrutura de (P₂O₅). (MOULDER *et al.*, 1992)

O espectro de alta resolução da Figura 5.11 (d) é referente ao nióbio $3d_{5/2}$, também foi ajustado e sua curva principal sofreu deconvolução, dando origem a outras duas curvas. Os picos estão em 206,8 eV, indicando a ligação do nióbio no composto CaNb_2O_6 e nióbio ligado ao oxigênio no composto Nb_2O_5 , ou seja, representando o nióbio em um estado de oxidação Nb^{+5} (BAHL, 1974; MOULDER *et al.*, 1992), e em 204,9 eV, referente ao nióbio ligado ao oxigênio (Nb-O) no composto NbO_2 .

A curva do cálcio 2p (Figura 5.11 (e)) indica uma energia em 347,0 eV, que sugere a ligação deste com duas estruturas diferentes e energias de ligação ao cálcio semelhantes. São elas o cálcio ligado a um carboxil, provavelmente da contaminação atmosférica, e o cálcio ligado a um metal e um oxigênio (Ca-O-metal), CaNbO_4 . (MOULDER *et al.*, 1992; HANAWA T. e OTA M., 1991)

A curva do fósforo 2p (na Figura 5.11 (f)) tem o pico de energia em 132,8 eV e pode ser atribuída ao fósforo ligado a oxigênio, representando íons PO_4^{3-} na estrutura do P_2O_5 . (MOULDER *et al.*, 1992)

Na Figura 5.12 (a) encontra-se um *espectro de baixa resolução* com todos os elementos presentes nos filmes depositados com 100 mJ, sendo esses os mesmos identificados pelo EDS.

Com a deconvolução do espectro de alta energia de carbono 1s (Figura 5.12 (b)) tem-se três diferentes energias de ligação, entre as quais a de 284,6 eV sugere a ligação do carbono com contaminação de superfície (CH_x); 286,3 eV indica a ligação de carbono com álcool e éster e um pico de energia em 288,5 eV indica a ligação do carbono com carboxila (COOH). (MOULDER *et al.*, 1992)

A Figura 5.12 (c) representa o espectro de alta resolução do oxigênio 1s. Os picos de energia em 529,8 eV e 530,9 eV indicam energias na faixa de ligação do oxigênio com um metal, sendo esse cálcio e nióbio, respectivamente. A ligação atribuída ao pico de energia em 532,5 eV é a do oxigênio com o fósforo (P_2O_5). (MOULDER *et al.*, 1992)

Pelo ajuste do espectro de alta resolução do nióbio $3d_{5/2}$ (Figura 5.12 (d)) tem-se a indicação de duas diferentes energias. Em 206,8 eV estão representadas a ligação do nióbio com oxigênio (Nb_2O_5) e do nióbio fazendo ligação na estrutura CaNb_2O_6 , em que o estado de oxidação do nióbio nos dois compostos é Nb^{+5} . O pico de energia em 204,8 eV sugere a ligação do nióbio com estados de oxidação +2 ligado ao oxigênio, provavelmente do composto (NbO_2). (BAHL, 1974; MOULDER *et al.*, 1992)

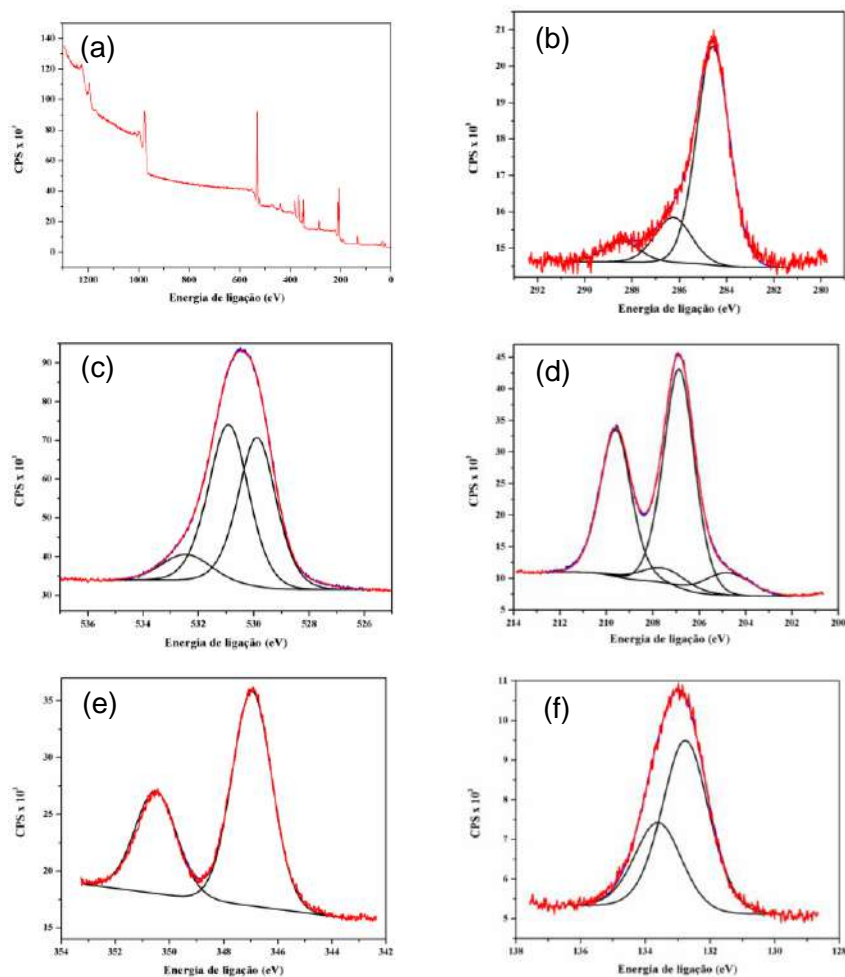


Figura 5.12: Espectros de XPS dos filmes depositados a 100 mJ: (a) *espectro de baixa resolução*; (b) espectro de alta resolução carbono; (c) espectro de alta resolução oxigênio; (d) espectro de alta resolução do nióbio; (e) espectro de alta resolução do cálcio; (f) espectro de alta resolução do fósforo.

O espectro de alta resolução do cálcio (Figura 5.12 (e)) tem sua energia de ligação em 346,9 eV, que pode ser atribuída à ligação do elemento com uma carboxila ou a ligação do cálcio em uma estrutura de CaNb_2O_6 (DEMRI e MUSTER, 1995). A Figura 5.12 (f) mostra o ajuste do fósforo e indica um pico de energia em 132,8 eV, que é atribuído à ligação desse com oxigênio na estrutura de P_2O_5 (GRESCH *et al.*, 1979; PELAVIN *et al.*, 1969). As energias de ligação medidas por XPS para as amostras depositadas estão apresentadas na Tabela 5.10. A partir das áreas medidas nos espectros de XPS dos filmes depositados em ambas as condições, foram calculadas as concentrações relativas dos elementos cálcio, nióbio e fósforo, como mostrado na Tabela 5.11.

Tabela 5.10: Energias de ligação medidas nos espectros de alta resolução de XPS dos filmes.

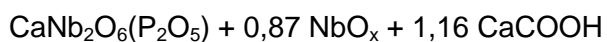
Elemento	Energia de ligação medidas nos filmes de 50 mJ (eV)	Energia de ligação medidas nos filmes de 100 mJ (eV)	Ligação
C (1s)	284,6	284,6	CH _x
	286,0	286,3	C-OH
	288,3	288,5	COOH
O (1s)	530,0	529,8	O-Ca
	531,0	530,9	O-Nb
	532,2	532,5	O-P
Nb (3d)	204,9	204,8	Nb-O
	206,8	206,8	Nb-O e/ou Ca-Nb-O
Ca (2p)	347,0	346,9	Ca-Nb-O e/ou Ca-COOH
P (2p)	132,8	132,8	P-O

Tabela 5.11: Dados da área dos picos e concentração relativa dos elementos que compõem os filmes depositados.

Elemento	Área (50 mJ)	Concentração relativa (50 mJ)	Área (100 mJ)	Concentração relativa (100 mJ)
Cálcio (2p)	30463	30,8%	30255	30,8%
Nióbio (3d)	65442	40,8%	64499	40,6%
Fósforo (2p)	6615	28,5%	6572	28,5%

Usando os valores da Tabela 5.11 nas equações 4.1 e 4.2, como mostrado na sessão 4.2.3, tem-se a identificação da quantidade e da estrutura química da superfície das amostras depositadas com 50 e 100 mJ de energia.

A composição da superfície para os filmes depositados com 50 mJ foi:



A composição da superfície para os filmes depositados com 100 mJ foram:



A partir dos resultados acima, pode-se sugerir ocorreu transferência estequiométrica do alvo para os filmes depositados em ambas as condições. Foi observado que a concentração dos constituintes do material foi alterada do alvo para os filmes. Além disso, as concentrações medidas para os filmes depositados com diferentes energias foram similares.

Para a identificação das fases cristalinas das amostras, foi realizada a análise de difração de raios-X com ângulo rasante, cujo resultado pode ser observado nos difratogramas representados na Figura 5.13 (a) 50 mJ e (b) 100 mJ. Segundo a análise dos difratogramas dos filmes, pode-se identificar a presença de regiões amorfas e picos representando fases cristalinas do titânio metálico de acordo com a ficha JCPDS 00-044-1294, relativas ao substrato em que o filme está depositado.

As áreas dos halos amorfos em ambos os difratogramas são aproximadamente iguais. A diferença visual entre os dois difratogramas é devida à discrepância entre as intensidades dos picos de titânio: como os eixos das ordenadas foram redimensionados para se adequar aos valores máximos dos dados, as áreas ficaram com aspectos diferentes.

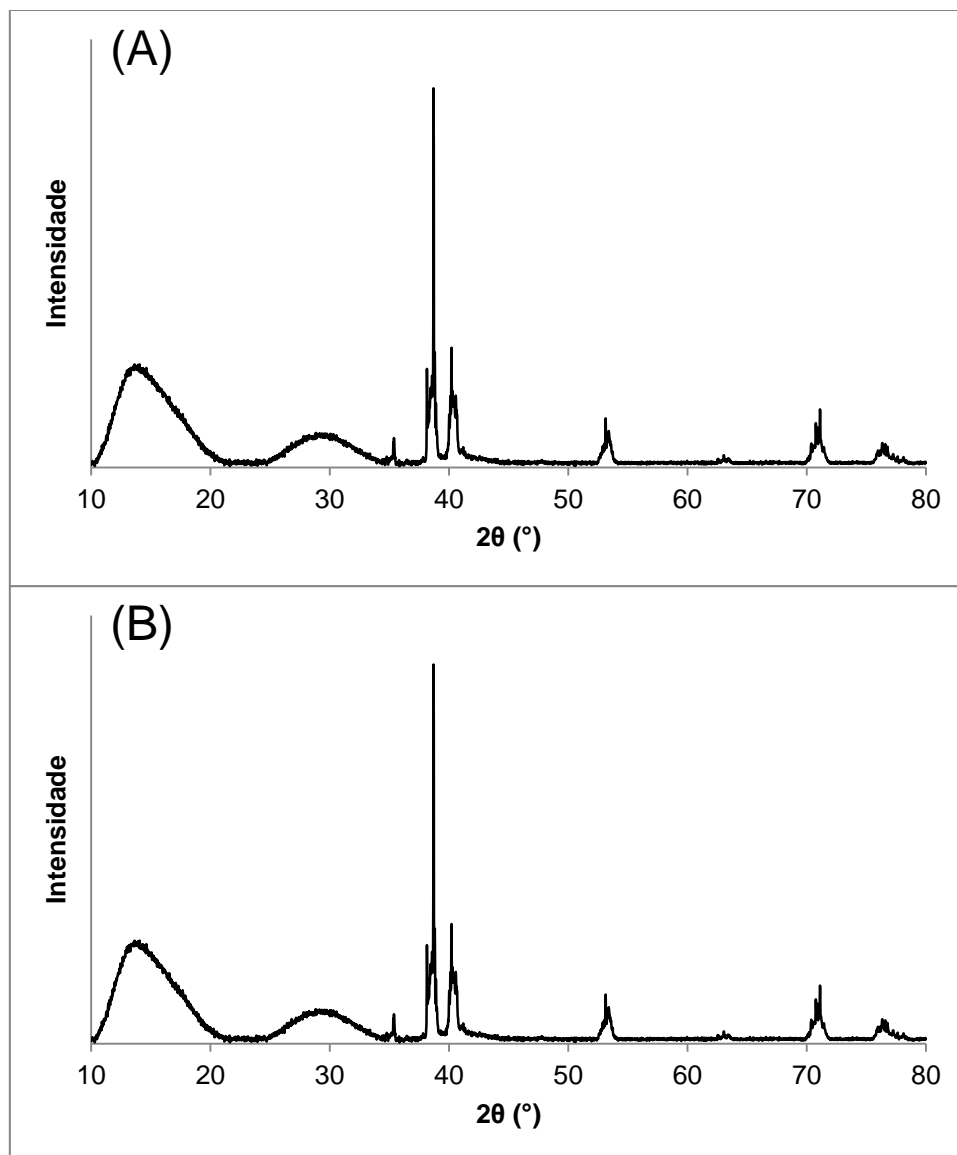


Figura 5.13: Difratomogramas dos filmes depositados com 50 mJ (a) e 100 mJ (b), onde é possível a identificação da presença de uma fase amorfa, sugerindo ser o filme e picos cristalinos do titânio advindo do substrato. Os eixos das ordenadas não se encontram na mesma escala.

Na Figura 5.14 encontra-se o perfil topográfico do filme depositado com 50 mJ e, na Figura 5.15, o filme do filme depositado com 100 mJ. Não foi possível fazer a avaliação da espessura dos filmes depositados, uma vez que a rugosidade, vinda dos *droplets*, é maior que a espessura dos filmes em si. Os picos observados no perfil são característicos dos *droplets* que estão presentes por toda superfície.

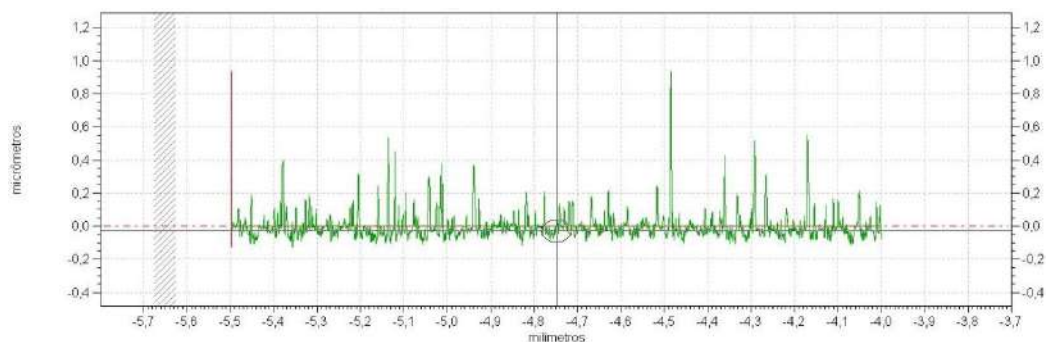


Figura 5.14: Perfil topográfico do filme depositado com 50 mJ. Os picos representam os *droplets* na superfície.

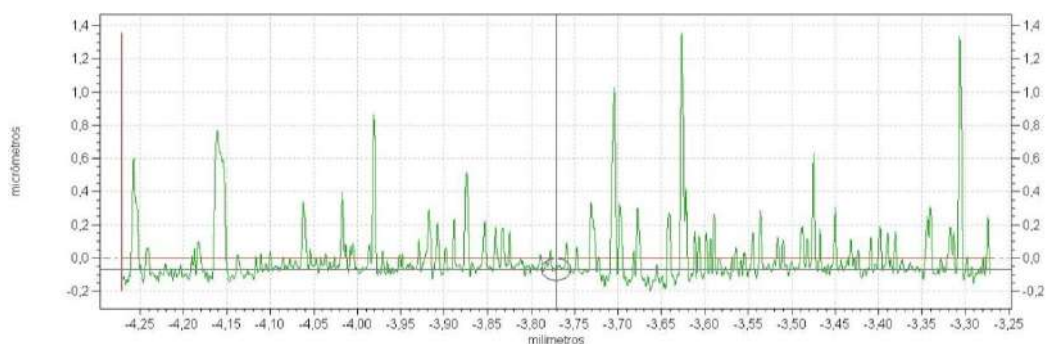


Figura 5.15: Perfil topográfico do filme depositado com 100 mJ.

Como não foi possível a avaliação da espessura das amostras por perfilometria, foram realizadas medições dos degraus dos filmes por AFM, procurando observar com uma maior resolução a interface entre filme e substrato. As Figuras 5.16 e 5.17 trazem as imagens dos degraus medidos por AFM, e a Tabela 5.12 mostra os valores medidos para a espessura dos filmes.

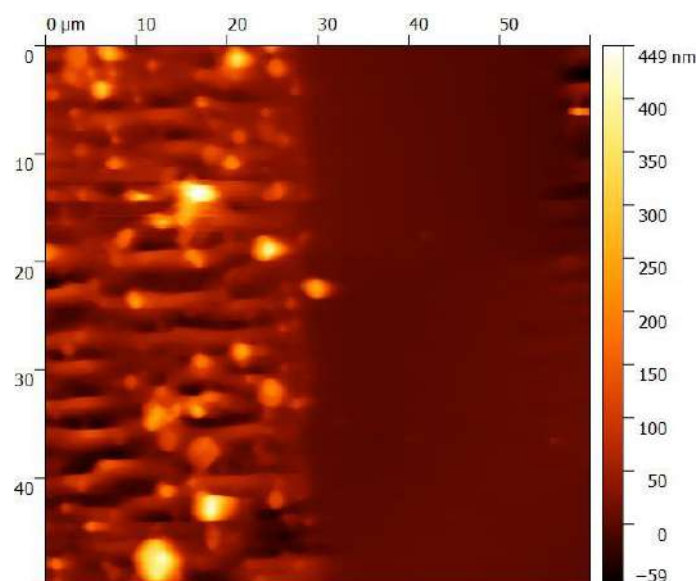


Figura 16: Imagem de AFM do filme depositado a 50 mJ. À direita se encontra o substrato de silício.

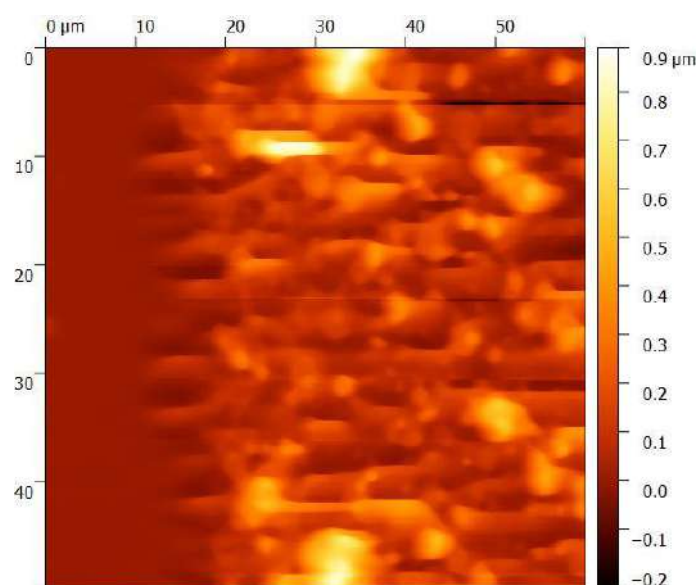


Figura 5.17: Imagem de AFM do filme depositado a 100 mJ. À esquerda se encontra o substrato de silício.

Tabela 5.12: Valores de espessura média obtidos por AFM.

	Espessura média (nm)	Desvio padrão (nm)
50 mJ	32,6	4,1
100 mJ	93,4	14,1

Por se tratar de um recobrimento na superfície de implantes dentários, é necessário que os filmes estejam bem aderidos aos substratos onde estão apoiados. Para a avaliação da adesão e da força necessária para arrancar os filmes, foi realizado teste de risco, ou *scratch test*. Os resultados desta caracterização não foram conclusivos, pois o preparo superficial dos substratos não foi compatível com a espessura do filme, impossibilitando a determinação da carga crítica. A Figura 5.18 mostra a micrografia em microscopia óptica, onde é possível perceber que não houve o rompimento completo do filme, pois existem áreas de descontinuidade e, entre as ranhuras provenientes do preparo do substrato, um filme que não foi removido pela ponta do equipamento.

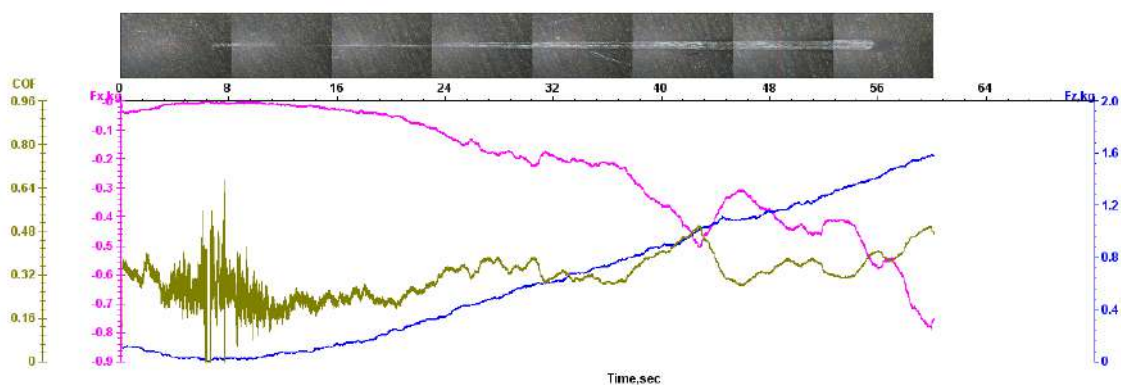


Figura 5.18: Coeficiente de atrito (verde), força de atrito (rosa) e carga aplicada (azul) medidos no ensaio de *scratch* em uma amostra de 100 mJ.

Ainda caracterizando a superfície dos filmes depositados, foi realizada a análise por medição de ângulo de contato. Pode-se observar, nas Figuras 5.19, 5.20 e 5.21, o ângulo de contato encontrado entre a superfície de titânio sem recobrimento, e as superfícies dos filmes depositados com energias de 50 e 100 mJ, respectivamente. Os valores dos ângulos medidos estão apresentados na Tabela 5.13. Segundo PATANKAR (2003), superfícies que apresentam ângulos de contato com a água menores que 90° podem ser consideradas hidrofílicas, característica fundamental para recobrimentos na superfície de implantes, pois melhoram a resposta e o espalhamento celular.

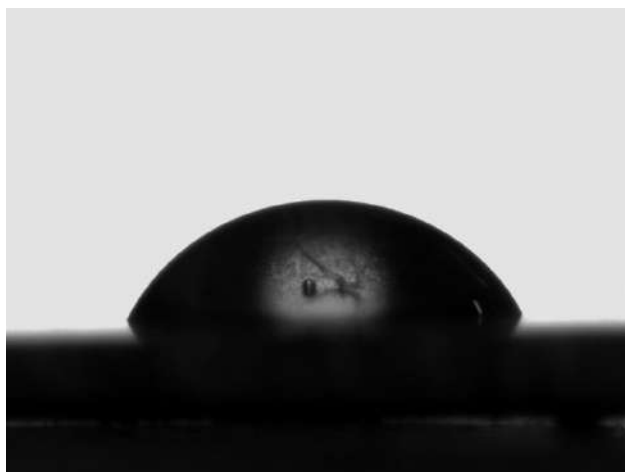


Figura 5.19: Ângulo de contato dos filmes depositados com 50 mJ.

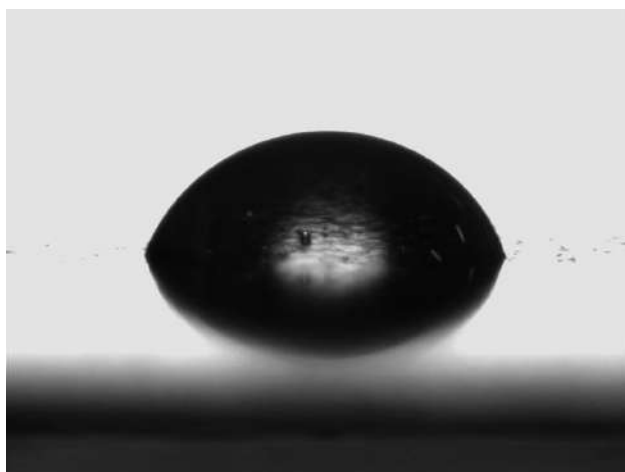


Figura 5.20: Imagem do ângulo de contato dos filmes depositados com 100 mJ.



Figura 5.21: Ângulo de contato no substrato de titânio comercialmente puro sem recobrimento.

Tabela 5.13: Valores médios do ângulo de contato e de desvio padrão das superfícies.

	Ângulo de contato médio (°)	Desvio padrão (°)
50 mJ	63,0	1,8
100 mJ	69,5	1,4
Titânio puro	90,6	0,7

O ensaio de proliferação celular foi realizado com linhagens celulares de pré-osteoblastos murinos (MC3T3) com o intuito de observar possíveis efeitos mitogênicos induzidos pela superfície recoberta com biovidro, uma vez que a proliferação celular ou um aumento na quantidade de células aderidas a superfície indica boa interação das células com o substrato.

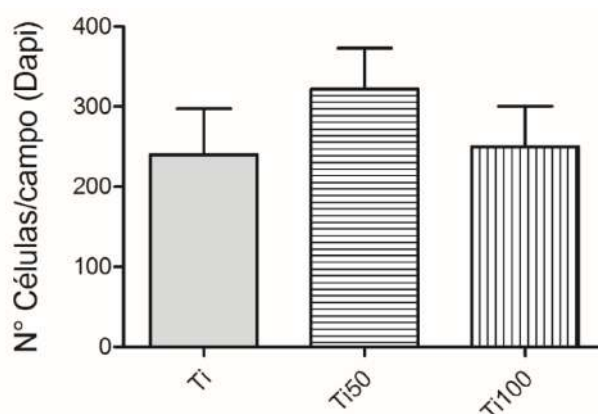


Figura 5.22: Resultado do ensaio de proliferação celular por marcação do núcleo (DAPI). Para análise estatística foi utilizado o método de análise de variância e pos-test de Dunnett para $p < 0,001$. As amostras depositadas a 50 mJ (Ti50) e 100 mJ (Ti100) foram comparadas ao substrato de titânio puro (Ti) e não apresentaram diferença significativa.

A Figura 5.22 traz um gráfico quantitativo do número de células aderidas às amostras de filmes depositados a 50 e 100 mJ, e ao substrato de titânio puro, após 48 horas da semeadura. O resultado é representativo da contagem de núcleos celulares marcados com DAPI, contatos a partir de imagens de células marcadas de oito regiões por amostra, em duplicata. Não houve diferença significativa entre as amostras apesar do sutil aumento observado na quantidade de células observado na amostra

depositada a 50 mJ, quando comparada ao controle (titânio puro). A amostra depositada a 100 mJ apresentou quantidade celular similar ao titânio puro.

A análise de formação de contato focal mostra como as células podem interagir com a superfície, por meio da microscopia de fluorescência. Células MC3T3 foram semeadas na superfície das amostras depositadas nas duas condições e do substrato de titânio puro durante 48 horas, sendo em seguida processadas para imunofluorescência com o intuito de observar as marcações: a interação de filamentos de actina com vinculina; e a organização dos filamentos de actina (fibras de estresse).

A Figura 5.23 mostra micrografias de células marcadas com vinculina (verde) e actina (vermelho), e o núcleo (azul). A interação da vinculina com os filamentos de actina caracteriza a formação de contato focal, importante para a melhor fixação das células ao substrato e pode ser observada nas micrografias em amarelo. Os resultados mostram que podemos observar uma boa interação das células com os materiais nas superfícies de todas as amostras analisadas, uma vez que houve formação de contato focal nas três superfícies. A presença de fibras de estresse representa a organização do citoesqueleto celular, indicando início de um grau favorável de diferenciação celular e pode ser analisada pela marcação em paralelo dos filamentos de actina. Nas micrografias podemos observar a presença das fibras de estresse nas três superfícies, no entanto, a melhor organização pode ser observada na superfície da amostra depositada a 100 mJ.

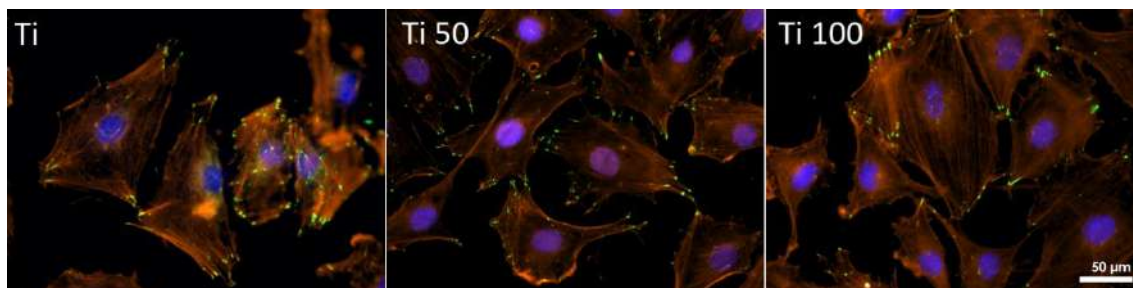


Figura 5.23: Micrografia de imunofluorescência de células MC3T3-E1 semeada nas superfícies de titânio puro (Ti), amostra depositada a 50 mJ (Ti50) e amostra depositada a 100 mJ (Ti100) durante 48 h.

6. Conclusão

O objetivo de se obter recobrimentos de biovidro contendo nióbio foi atingido. Filmes depositados por PLD sobre titânio comercialmente puro, a partir de alvos de vidro niobo-fosfato, exibiram composição compatível com o material precursor e boas propriedades biológicas.

A síntese do biovidro, a produção do alvo e a deposição dos filmes de biovidro foram reprodutíveis em todas as etapas.

O alvo e os filmes depositados apresentam composição química semelhante no alvo e no filme, como sugerido pela literatura da técnica.

Os ensaios celulares mostraram boa resposta na interação entre a célula e a superfície do material, havendo a formação de contatos focais, o que sugere um potencial de biocompatibilidade na superfície.

7. Sugestões para trabalhos futuros

- Testar os recobrimentos quanto à sua bioatividade;
- Aprimorar os ensaios celulares;
- Refazer os testes de risco;
- Avaliar a espessura por microscopia eletrônica de varredura com seção transversal;
- Depositar biovidro com diferentes comprimentos de onda do laser.

8. Referencias bibliográficas

- ALBERTS, B., "Citoesqueleto". In: RENARD, G., HIES, J. M., 2010, *Biologia molecular da Célula*, 5ª ed. Cap 16. Artmed, Porto Alegre, Brasil.
- ALBREKTSSON, T., 1985, "The response of bone to titanium Implants", *Crit. Rev. Biocompatibility*, v. 1, pp. 53-84.
- ALBREKTSSON, T., ZARB, G., WORTHINGTON, P., *et al.*, 1986, "The long-term efficacy of currently used dental implants: a review and proposed criteria of success", *Int J Oral Maxillofac Implants*, v. 1, pp. 11-25.
- AMARAL, M., LOPES, M., SILVA, R., *et al.*, 2002, "Densification route of Si₃N₄ – bioglass biocomposites", *Biomaterials*, v. 23, pp. 857-862.
- ANDERSSON, O., KARLSSON, K., HERO, H., *et al.*, 1995, "Bioactive double glass coatings for Co-Cr-Mo alloy", *J. Mater. Med.*, v. 6, pp. 242-247.
- ANDRADE, A., VALERIO, P., GOES, A., *et al.*, 2006, "Influence of morphology on in vitro compatibility of bioactive glasses", *J. Non-Crystal. Solids*, v. 352, pp. 3508-3511.
- BAHL, M., 1975, "ESCA studies of some niobium compounds", *J. Phys. Chem. Solids*, v. 36, pp. 485-491.
- BAUER, S., SCHMUKI, P., VON DER MARK, K., *et al.*, 2013, "Engineering biocompatible implant surfaces Part I: materials and surfaces", *Prog Mater Sci*, v. 58, pp. 261–326.
- BERBECARU, C., ALEXANDRU, H., IANCULESCU, A., *et al.*, 2009, "Bioglass thin films for biomimetic implants", *Applied Surface Science*, v. 255, pp. 5476.
- BERBECARU, C., STAN, G., PINA, S., *et al.*, 2012, "The bioactivity mechanism of magnetron sputtered bioglass thin films", *Applied Surface Science*, v. 258, pp. 9840-9848.
- BRANEMARK, P., HANSSON, B., ADELL, R., *et al.*, 1969, "Intraosseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies" *Scand J. Plast Reconstruction Surg.*, v.3. pp. 81.
- BRANEMARK, P., HANSSON, B., ADELL, R., *et al.*, 1977, "Osseointegrated implants in the treatment of edentulous jaw. Experience from a 10-year period", *Scand J Plast Reconstr Surg Suppl*, v. 16, pp. 1-192.

CARBONARI, M., FARIA JR., L., KOENIG JR., B., *et al.*, 2004, "Bioactive calcium niobium phosphate glasses for bone implants associated with metallic, polymeric or morphogenetic proteins", Patente Internacional WO2004026781 A1.

CATE, T., 1994, *Histologia Bulcal, Estrutura e Função*, 5ª edição, Editora Guanabara.

CHATTERJEE, A., ZHMOIDIN, G., 1972, "The phase equilibrium diagram of the system CaO-Al₂O₃-CaF₂", *J. Mater. Sci.*, v. 7, pp. 93-97.

CHEN, Q., THOMPSON, I., BOCCACINI A., 2006, "45S5 bioglass-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering", *Biomaterials*, v. 27, pp. 2414-2425.

CLARK, A., PANTANO, C., HENCH, L., 1976, "Auger spectroscopic analysis of Bioglass corrosion films", *J. Am. Ceram. Soc.*, v. 59, pp. 37-39.

CROVACE, M., SOUZA, M., CHINAGLIA, C., *et al.*, 2016, "Biosilicate – A multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. In vitro, in vivo and clinical trials", *Journal of Non-Crystalline Solids*, v.432, pp.90-110.

D'ALESSIO, L., TEGHIL, R., ZACCAGNINO, M., *et al.*, 1999, "Pulsed laser ablation and deposition of bioactive glass as coating material for biomedical applications", *Appl.Surf.Sci.*, v. 138-139, pp. 527-532.

DAGUANO, J., 2011, *Biovidros e vitrocerâmicos bioativos do sistema 3Ca.P₂O₅-SiO₂-MgO para aplicações biomédicas: processamento e caracterizações estruturais, mecânica e biológicas*. Tese de D.Sc., USP/EEL, São Paulo.

DE GROOT, K., 1998, "Calcium phosphate coatings: an alternative to plasma spray", *Proceedings of the 11th Bioceramics*, pp. 41-43.

DEMRI, B. E MUSTER, D., 1995, "XPS study of some calcium compounds" *Journal of Materials Processing Technology*, v. 55, pp. 311-314.

DENRY, I., HOLLOWAY, J., GUPTA, P., 2012, "Effect of crystallization heat treatment on the microstructure of niobium-doped fluorapatite glass-ceramics", *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, v. 100, pp. 1198-2205.

DUCHEYNE, P., QIU, Q., 1999, "Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function", *Biomaterials*, v. 20, pp. 2287-3303.

DURACCIO, D., MUSSANO, F., FAGA, M., 2015, "Biomaterial for dental implants: current and future trends", *J. Material Science*, v. 50, pp. 4779-4812.

EASON, R., 2007, *Pulsed Laser Deposition of Thin Films*, Hoboken, EUA, Wiley-Interscience.

ELIAS, C., MEIRELLES, L., 2010, "Improving osseointegration of dental implants", *Experts Rev Med Devices*, v. 7, n. 2, pp. 241-256.

ELIAS, C., OSHIDA, Y., LIMAD, J., *et al.*, 2008, "Relationship between surface properties, roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque", *J Mech Behav Biomed Mater*, v. 1, pp. 234-242.

EVARD, L., PARENT, D., 2010, "Allergies to dental metals. Titanium: a new allergen", *Rev Med Brux*, v. 31, n. 1, pp. 44-49.

FERNANDES, G., ALVES, G., LINHARES, A., *et al.*, 2012, "Evaluation of cytocompatibility of bioglass-niobium granules with human primary osteoblasts: A multiparametric approach," *Key Eng. Mater.*, v. 493-494, pp. 37-42.

FLOROIAN, L., SAVU, B., STANCIU, G., *et al.*, 2008, "Nanostructured bioglass thin films synthesized by pulsed laser deposition: CSLM, FTIR investigations and in vitro biotests", *Applied Surface Science*, v. 255., pp. 3056-3062.

FLOROIAN, L., FLORESCU, M., SIMA, F., *et al.*, 2012, "Synthesis of biomaterial thin films by pulsed laser Technologies: Electrochemical evaluation of bioactive glass-based nanocomposite coatings for biomedical applications", *Materials Science and Engineering*, v. 32, pp. 1152-1157.

FU, Q., RAHAMAN, M., BAL, B., *et al.*, 2008, "Mechanical and in vitro performance of 13–93 bioactive glass scaffolds prepared by a polymer foam replication technique." *Acta Biomater*, v. 4, pp. 1854-1864.

GOEL, A., KAPOOR, S., RAJAGOPAL, R., *et al.*, 2012, "Alkali-free bioactive glasses for bone tissue engineering: A preliminary investigation", *Acta Biomaterialia*, v. 8, pp. 361-372.

GOLDSTEIN, J., NEWBURY, D., ECHLIN, P., *et al.*, 2003, *Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis*, 3 ed., Nova Iorque, Springer US.

HANAWA, T. e OTA, M., 1991, "Calcium phosphate naturally formed on titanium electrolyte solution", *Department of Dental Materials and Engineering*, Japan.

HEIMAN, R., 2013, "Structure, properties, and biomedical performance of osteoconductive bioceramics coatings", *Surface & Coatings Technology*, v. 233, pp. 27-38

HEIMAN, R., ITIRAVIVONG, P., PROMASA, A., 2004, "In vivo Untersuchunhin zur Osteointegration", *Biomaterialien*, v. 5, pp. 38-43

- HENCH, L., SPLINTER, R., GREENLEE, T., *et al.*, 1971, "Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials", *J. Biomed. Mater. Res. Symp.*, v. 2, pp. 117-141.
- HENCH, L., 1991, "Bioceramics: From Concept to Clinic", *Journal of American Ceramic Society*, v. 74, n. 7, pp. 1487-1510.
- HENCH, L., ANDERSSON, O., 1993, *Bioactive Glasses*, In: HENCH, L., WILSON J. (ed.), *An introduction to Bioceramics*, pp. 41-62, Cingapura, World Scientific Publishing.
- HENCH, L., 1998, "Biomaterials: a forecast for the future", *Biomaterials*, v. 19, pp. 1419-1423.
- HENCH, L., POLAK, J., 2002, "Third-generation Biomedical", *Material Science*, v. 295, pp. 1014-1017.
- HENCH, L., 2006. "The story of Bioglass", *Journal Material Science Mater Med*, v.17, pp. 967-978.
- IAEA, 1970, Radioisotope X-ray fluorescence Spectrometry. Viena, International Atomic Energy Agency, Technical Reports series v.115, pp. 102
- ITIRAVIVONG, P., PROMASA, A., LAIPRASERT, T., *et al.*, 2003, "Comparison of tissue reaction and osteointegration of metal implants between hydroxyapatite/Ti alloy coat: an animal experimental study", *J Med Assoc Thai*, v. 86, pp. S422-S431.
- JONES, J., 2013, "Review of bioactiveglass: From Hench to Hybrids". *Acta Biomaterialia*, v.9, pp.4457-4486.
- JUNQUEIRA, L., CARNEIRO, J., 1995, *Histologia Básica*, Rio de Janeiro, Koogan S.A.
- JUNQUEIRA, L., CARNEIRO, J., 2004, *Histologia Básica*, Rio de Janeiro, Koogan S.A.
- KAMITAKAHARA, M., OHTSUKI, C., MIYAZAKI, T., 2008, "Review Paper: Behavior of Ceramic Biomaterial Derived from Tricalcium Phosphate in Physiological Condition". *Journal of Biomaterials Applications*, v.23, pp.197-212.
- KATTO, M., NAKAMURA, M., TANAKA, T., *et al.*, 2003, "Hydroxyapatite coatings using novel pulsed laser ablation methods", *Surf. Coat. Technol.*, v. 169-170, pp. 712-715.
- KAUR, G., PANDEY, O., SINGH, K., *et al.*, 2013, "A review of bioglasses: Their structure, properties, fabrication and apatite formation". *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 102, pp. 254-274.

- KIM, H., CAMATA, R., VOHRA, Y., *et al.*, 2005, "Control of phase composition in hydroxyapatite/tetracalcium phosphate biphasic thin coatings for biomedical applications", *J. Mater. Sci., Mater. Med.*, v. 16, n. 10, pp. 961-966.
- KOKUBO, T., KIM, H., KAWASHITA, M., 2003, "Novel bioactive materials with different mechanical properties", *Biomaterials*, v. 24, pp. 2161-2175.
- KOKUBO, T., TAKADAMA, H., 2006, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?" *Biomaterials*, v. 27, pp. 2907-2915.
- KOKUBO, T., YAMAGUCHI, S., 2010, "Novel Bioactive titanate Layers Formed on Ti Metal and Ti Alloys by Chemical Treatments", *Materials*, v. 3, pp. 48-63.
- KUSHWAHA, M., PAN, X., HOLLOWAY, J., *et al.*, 2012, "Differentiation of human mesenchymal stem cells on niobium-doped fluorapatite glass-ceramics," *Dent. Mater.*, v. 28, n. 3, pp. 252-260.
- LIMA, C., SILVA, I., BARROS, L., *et al.*, 2011, "Resposta do tecido subcutâneo de camundongos a implantação de um novo biovidro a base de óxido de nióbio", *Matéria*, v. 16, pp. 16574-82.
- LISTE, S., GONZALEZ, P., SERRA, J., *et al.*, 2004, "Study of stoichiometry transfer in pulsed laser deposition of bioactive silica-based glasses", *Thin Solids Films*, v. 453-454, pp. 219-223.
- MA, J., CHEN, C., WANG, D., *et al.*, 2013, "Preparation and apatite formation on CaO-MgO-P₂O₅-SiO₂ glass film grown by pulsed laser deposition", *Journal of Non-Crystalline Solid*, v. 382, pp. 5-10.
- MACHADO, J., 2007, *Desenvolvimento de Cimento ósseo de Fosfato de Cálcio com Suporte para o Crescimento de Tecidos*. Dissertação de M.Sc., UFRGS, Porto Alegre.
- MANSUR, H., 2004, "Cap. 7 – Técnicas de Caracterização de Materiais". In: ORÉFICE, R.; MANSUR, H.; PEREIRA, M.; *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*. Rio de Janeiro, v.1, pp. 70-95.
- MARTINS, T., BURLINGAMS, R., VAN MUHLEN, C., *et al.*, 2004, "Evaluation of multiplexed fluorescent microsphere immunoassay for reflection of antibodies to nuclear antigens", *Clin Diagn Lab Immunol*, v. 11, pp. 1054-1059.
- MOULDER, J., STICKTLE, W., SOBOL, P., *et al.*, 1992, "Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy"; *Perkin-Elmer Corporation*, United State of America.

- NASCIMENTO FILHO, V., 1999, *Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (ED-XFR) e por reflexão total (TXRF)*. Tese de D.Sc., USP, São Paulo.
- NISTOR, L., GHICA, C., TEODORESCU, V., *et al.*, 2004, "Deposition of hydroxyapatite thin films by Nd:YAG laser ablation: a microstructural study", *Mater. Res. Bull.*, v. 39, n. 13, pp. 2089-2101.
- OBATA, A., TAKAHASHI, Y., MIYAJIMA, T., *et al.*, 2012, "Effects of Niobium Ions Released from Calcium Phosphate Invert Glasses Containing Nb₂O₅ on Osteoblast-Like Cell Function", *Appl. Mater. Interfaces*, v. 4, pp. 5684-5690.
- OLIVEIRA, P., NANJI, A., 2004, "Nanotexturing of titanium-based surfaces upregulates expression of bone sialoprotein and osteopontin by cultured osteogenic cells", *Biomaterials*, v. 25, n. 3, pp. 403-413.
- ORTIZ, I., SANTOS A., COSTA A., *et al.*, 2016, "In Vitro Assessment Of Zinc Apatite Coatings On Titanium Surfaces", *Ceramics International*, v. 42, pp. 15502-15510.
- OSATHANON, T., BESPINYOWONG, K., ARKSORNNUKIT, M., *et al.*, "Ti-6Al-7Nb promotes cell spreading and fibronectin and osteopontin synthesis in osteoblast-like cells", *J Mater Sci: Mater Med*, v. 17, pp. 619-625.
- PATANKAR, N., 2003, "On the Modeling of Hydrophobic Contact Angles on Rough Surfaces". *Langmuir*, v. 19, pp. 1249-1253.
- PFEIFFER, F., HERZOG, B., KERN, D., *et al.*, 2003, "Cell reaction to microstructured implant surfaces". *Microelectronic Engineering*, v. 67-68, pp. 913-922.
- RAU, J., TEGHIL, R., FOSCA, M., *et al.*, 2012, "Bioactive glass-ceramic coatings prepared by pulsed laser deposition from RKKP targets (sol-gel VS melt-processing route", *Materials Research Bulletin*, v. 47, pp. 1130-1137.
- RAVAGLIOSO, A., KRAJEWSKI, A., 1992, *Bioceramics: Materials, Properties, Applications*. Nova Iorque, EUA, Chapman & Hall.
- ROCHA, D., 2014, *Síntese e Caracterização de Hidroxiapatita manométrica parcialmente substituída com Nióbio*. Dissertação de M.Sc., IME, Rio de Janeiro.
- ROSS, M., ROWRELL, L., 1993, *Histologia texto e atlas*. São Paulo, Panamericana.
- SANTOS, A., 2008, *Efeito da oxidação anódica de Titânio comercialmente puro revestidos ou não com fibronectina na interface de osteoblastos humano*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro.

SEPÚLVEDA, P., PANDOLFELLI, V., 1999, "Hidroxiapatita porosa produzida através do gelcasting de espumas visando aplicações biomédicas", *Cerâmica*, v. 45, n. 296, pp.1-12.

SENE, F., MARTINELLI, J., GOMES, L., 2004, "Synthesis and characterization of niobium phosphate glasses containing barium and potassium", *J. Non-Crystalline Solids*, v. 348, pp. 30-37.

SERRA, J., GONZALÉZ, P., CHIUSSI, S., *et al.*, 2001, "Processing of Bioglass Coatings by Excimer Laser Ablation", *Key Eng. Mater.*, v. 192-195, pp. 635-638.

SHAPOFF, C., ALEXANDER, D., CLARK, A., 1997, "Clinical use of a bioactive glass particulate in treatment of human osseous defects", *Compend Contin Educ Dent.*, v. 18, n. 4, pp. 352-358.

SILVA, M., 1999, "*Recobrimentos de titânio com hidroxiapatita: desenvolvimento do processo de deposição eletrolítica e caracterização biológica in vitro*". Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro.

SILVA, M., RAMIREZ, C., GRANJEIRO, J., *et al.*, 2008, "In vitro assessment of new Niobium Phosphate Glasses and Glass Ceramics", *Key Eng. Mat.*, v. 361-363, pp. 229-232.

STACY, N., LU, Z., CHEN, Z., *et al.*, 1989, "Biodegradable natural-synthetic polymer graft copolymers", *ANTEC*, pp. 1362-1364.

STAN, G., POPA, A., GALCA, A., *et al.*, 2013, "Strong bonding between sputtered bioglass–ceramic films and Ti-substrate implants induced by atomic inter-diffusion post-deposition heat-treatments", *Applied Surface Science*, v. 280, pp. 530-538.

SCHOEDER, A., SUTTER, F., KREKELER, G., 1997, "Implantologia dental", São Paulo: Médica Panamericana, capítulo1, pp.4.

TAKADAMA, H., HASHIMOTO, M., MIZUNO, M., *et al.*, 2004, "Round-robin test of SBF for in vitro measurement of apatite-forming ability of synthetic materials", *Phosphorous Research Bulletin*, v. 17, pp. 119-125.

TAMAI, M., ISAMA, K., NAKAOKA, R., *et al.*, 2007, "Synthesis of a novel b-tricalcium phosphate/hydroxyapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of its osteogenic properties", *J. Art. Org.*, v. 10, pp. 22-28.

TANASKOVISC, D., JOKIC, B., SOCOL, G., 2007, "Synthesis of functionally graded bioactive glass-apatite multistructures on Ti substrates by pulsed laser deposition", *Applied Surface Science*, v. 254, pp. 1279-1282.

TANG, P., SONG, R., CHAI, G., *et al.*, 2012, "Microstructure and nanoindentation hardness of TiN/AlN multilayer films prepared by pulsed laser deposition", *Surf. Eng.*, v. 28, n. 3, pp. 165-170.

TENGVAL, P., LÜNDSTROM, I., 1992, "Physical chemical considerations of titanium as a biomaterial", *Clinical Materials*, v. 9, pp. 115-134.

WANG, D., CHEN, C., MA, Q., *et al.*, 2013, "A study on in vitro and in vivo bioactivity of HAQ45S5 composite films by pulsed laser deposition", *Applied Surface Science*, v. 270, pp. 667-674.

WANG, D., CHEN, C., JIN, Q., *et al.*, 2014, "HA/Bioglass composite films deposited by pulsed laser with different substrate temperature", *Appl Phys A*, v. 114, pp. 897-902.

WHEELER, D., STOKES, K., HOELLRICH, R., *et al.*, 1998, "Effect of bioactive glass particle size on osseous regeneration of cancellous defects", *J. Biomed. Mater Res.*, v. 41, pp. 527-533.

WILLIAMS, D., 1986, *Definitions in Biomaterials: Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials*. Elsevier Science Ltd., Chester, Inglaterra.

WILSON, J., 1997, "Biocompatibility and Tissue Response to Implants", *Anales de Quimica International Edition*, v. 93, n. 1.

XYNOS, I., HUKKANEN, M., BATTEN, J., *et al.*, 2000, "Bioglass 45S5® stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation in vitro: Implications and applications for bone tissue engineering", *Calcif. Tissue Int.*, v. 67, pp. 321-329.

ZAVAGLIA, C., 1993, *Uso de Biomateriais Cerâmicos em Próteses Ortopédicas*. Tese de Livre-docência, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.